

Hovedoppgave for Cand.Scient-graden

av

Ingvild Flåtten

Mutagenese, ekspresjon og karakterisering av
DNA polymerase I fra den varmestabile bakterien
Thermotoga Maritima



Biokjemisk institutt
Det matematisk-naturvitenskapelige fakultet
UNIVERSITETET I OSLO
Februar 2003

Forord

Denne oppgaven ble utført i tidsrommet januar 2001 til januar 2003, under veiledning av Professor Tom Kristensen på Biokjemisk institutt ved universitetet i Oslo.

Arbeidet under Tom Kristensens veiledning har gitt meg en grundig innføring i DNA polymeraser, og deres struktur og virkemåte.

I tillegg har arbeidet med denne hovedoppgaven gitt meg innblikk i mange bioteknologiske teknikker både på DNA-nivå og protein-nivå, og jeg føler at jeg sitter igjen med mye ny kunnskap.

Jeg vil takke alle de som har hjulpet meg med nye metoder, kommet med nyttige tips og støtte og oppmuntring i ”tunge stunder”. Nevner i tillegg til Tom Kristensen mine med-studenter Nina og Anton, og stipendiatene Ave Toming og Heidi Tveit.

Jeg vil også takke Lise Ramberg for hjelp og kommentarer under skrivingen av denne oppgaven, Nina Birkeland for mye god hjelp med Excel og Henriette Hojem for hjelp til korrekturlesning. Til slutt vil jeg takke min samboer, Nicolai, og min familie for all god støtte.

Oslo, november 2002

Ingvild Flåtten

Sammendrag

Alle levende organismer inneholder en eller flere DNA polymeraser, og dette enzymet er helt nødvendig for videreføring av arvestoffet fra generasjon til generasjon. DNA-polymeraser har også etter hvert fått en uvurderlig rolle i flere bioteknologiske teknikker. En av disse teknikkene er DNA-sekvensering ved hjelp av kjedeterminering, det vil si ved inkorporering av dideoksynukleotider. Det er derfor interessant å forsøke å utvikle DNA polymeraser med forbedrete og tilpassede egenskaper til slike teknikker.

I denne oppgaven ble det arbeidet med DNA polymerase I fra *Thermotoga Maritima*, *Tma* polymerase I. *Thermotoga Maritima* er en varmestabil bakterie noe som vil si at den vokser ved høyere temperaturer enn de fleste bakterier. *Thermotoga Maritima* har et temperaturoptimum ved 80°C. Det å benytte en DNA polymerase fra denne bakterien er derfor en fordel i sekvensering ved kjedeterminering hvor DNA-fragmentene blir denaturert ved 95°C i hver syklus. Hvis man da benytter varme-stabile DNA polymeraser trenger man ikke å tilsette nytt enzym for hver syklus.

Det finnes allerede flere varmestabile DNA polymeraser som benyttes i sekvensering, blant annet DNA polymerase I fra *Thermus Aquaticus* (*Taq*) med mutasjonen F667Y. Denne varianten av *Taq* polymerase I har en forbedret evne til inkorporering av ddNTP, noe som gjør det til et bedre sekvenseringsenzym.

I denne oppgaven ble denne mutasjonen innført i tilsvarende posisjon hos *Tma* polymerase I; Fenylalanin i posisjon 730 ble substituert med en tyrosin ved hjelp av setestyrkt mutagenese. Dette skulle føre til nedsatt diskriminering mot inkorporering av ddNTP.

Deretter ble både nativ og mutert *Tma* polymerase uttrykt i *E.coli*-celler og det ble laget lysat som inneholdt de aktive enzymene. Optimal ekspresjonstid, lineært område og antall enheter i lysatene ble bestemt ved hjelp av en fluorescensbasert aktivitetsanalyse.

Deretter ble lysatene forsøkt rensset uten særlig hell, så videre undersøkelser av enzymene ble gjort på grovlysaten.

De to enzymene ble testet i sekvensering ved kjedetermineringsmetoden. Det ble da bevist at mutasjonen har den ønskede effekten, da den muterte varianten fungerte godt under betingelser som var tilpasset den muterte varianten av *Taq* (F667Y). Den native fungerte ikke under disse betingelsene, men krevde en veldig mye høyere konsentrasjon av dideoksynukleotider. Disse analysene ble gjort på Alfexpress™ hvor det benyttes en fluorescensmerket primer for å detektere fragmentene.

Det ble også på Alfexpress™ gjort sammenligninger mellom nativ *Taq* polymerase og nativ *Tma* polymerase. Resultatene her tydet på at *Tma* er et dårligere sekvenseringsenzym enn *Taq* polymerase.

De siste undersøkelsene som ble gjort var å benytte den muterte varianten av *Tma* polymerase med fluorescensmerkede dideoksynukleotider på MegaBACE-systemet. Dette ble gjort med tanke på å sammenligne *Tma* polymerase (F730Y) med polymerasen som benyttes i det kommersielle kitet. Da *Tma* polymerase ikke fungerte i dette systemet under betingelsene som ble forsøkt, var det ikke mulig å sammenligne de to polymerasene.

Forkortelser

Her er en liste over forkortelser og uttrykk brukt for ulike bakterier, stoffer, løsninger osv. som er beskrevet i oppgaven. Det er også tatt med oversikt over aminosyrer og nukleinsyrer og deres forkortelser. Prefikser som benyttet i oppgaven er også forklart.

aa	Aminosyre
amp	Ampicillin
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosin-trifosfat
bp	Basepar
BSA	Bovint serumalbumin
bis-akrylamid	N,N'-metylenbisakrylamid
<i>Bca</i>	<i>Bacillus caldotenax</i>
<i>Bce</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Bst</i>	<i>Bacillus stearothermophilus</i>
C-terminal	Karboksytsyre-enden av et polypeptid
CV	Kolonnevolum
Cy5	Navn på et bestemt fluoriserende indokarbocyanin
ddNTP	2',3'-dideoksynukleosid-5'-trifosfat
DMSO	Dimetylsulfoksid
DNA	Deoksyribonukleinsyre
dNTP	2'-deoksynukleosid-5'-trifosfat
DOC	Deoksyholat
dsDNA	Dobbeltrådet DNA (double stranded)
DTT	Ditiotreitol
dNMP	2'-deoksynukleosid-5'-monofosfat
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Etylendiamintetraacetat
EMBL	The European Molecular Biology Laboratory
<i>et al.</i>	Og andre (Latin: <i>et alibi</i>)
EtBr	Etidiumbromid
Fig.	Figur
FS	Fluorescent Sequencing
FY	Mutasjon fra fenylalanin (F) til tyrosin (Y)
<i>In vitro</i>	Prosess som skjer i reagensrøret
<i>In vivo</i>	Prosess som skjer i de opprinnelige cellene
IPTG	Isopropyl-thio- β -galaktosid
kap.	kapittel
kb	Kilobaser
kDa	Kilodalton
Klenow	Klenow-fragmentet til DNA polymerase I fra <i>E.coli</i>
LB-medium	Luria/Bertani buljong
min	minutt

mRNA	Messenger RNA
NaOAc	Natriumacetat
N-terminal	Aminosyre-enden av et polypeptid
NTP	Nukleotid-trifosfat
OD ₆₀₀	Optisk tetthet ved 600 nm (optical density)
PAGE	Polyakrylamidgelelektroforese
PCR	Polymerasekjedereaksjonen (Polymerase Chain Reaction)
PEG	Polyetylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
PIPES	Piperazin-N, N'-bis(2-etansulfonsyre)
PMSF	Fenylmetylsulfonyl-fluorid
pol I	DNA polymerase I
PP _i	Pyrofosfat
RNA	Ribonukleinsyre
rpm.	Omdreining pr. minutt
rRNA	Ribosomalt RNA
RT	Romtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat (sodium dodecylsulphate)
sek	sekund
ssDNA	Enkeltrådet DNA (single stranded)
TAE-buffer	Tris-Acetate-EDTA-buffer
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE-buffer	Tris-borat-EDTA-buffer
TCA	Triklorediksyre
TE-buffer	Tris-EDTA-buffer
TEMED	N, N, N, N-tetrametylenetylen-diamintrinatriumcitrat
T _m	Smeltepunkt
<i>Tma</i>	<i>Thermotoga maritima</i>
Tris	Trishydroksylmetylammoniummetan (Tris-base)
U	Enzymenheter (units)
UiO	Universitetet i Oslo
UV-lys	Ultrafiolett lys
V	Volt
Å	Ångstrøm (10 ⁻¹⁰ m)

Aminosyre Forkortelse 1-bokstavforkortelse

Alanin	Ala	A
Arginin	Arg	R
Asparagin	Asn	N
Asparaginsyre	Asp	D
Cystein	Cys	C
Fenylalanin	Phe	F
Glutamin	Gln	Q
Glutaminsyre	Glu	E
Glysin	Gly	G
Histidin	His	H
Isoleusin	Ile	I
Leusin	Leu	L
Lysin	Lys	K
Metionin	Met	M
Prolin	Pro	P
Serin	Ser	S
Threonin	Thr	T
Tryptofan	Trp	W
Tyrosin	Tyr	Y
Valin	Val	V

Innholdsfortegnelse

Forord.....	I
Sammendrag	II
Forkortelser	III
Innholdsfortegnelse.....	VI
1.0 Innledning	1
1.1 DNA polymeraser.....	1
1.1.1 Hva er DNA polymeraser	1
1.1.2 Inndeling av DNA polymeraser i ulike familier	1
1.1.3 Strukturen til familie A DNA polymeraser.....	3
1.1.4 Funksjonene til familie A DNA polymeraser	5
1.2 DNA polymeraser i genteknologi.....	14
1.2.1 Ønskede egenskaper hos polymeraser ved bruk i PCR	14
1.2.2 Ønskede egenskaper hos polymeraser ved bruk i sekvensering	15
1.2.3 Forbedringer av polymeraser ved <i>in vitro</i> mutagenese.....	16
1.3 DNA polymerase I fra <i>Thermotoga maritima</i>	16
1.3.1 <i>Thermotoga maritima</i>	16
1.3.2 Evolusjon	16
1.3.3 <i>Tma</i> polymerase I.....	17
1.4 Målet med oppgaven.....	18
2.0 Metoder	19
2.1 Arbeid med mikroorganismer	19
2.1.1 Sterilteknikk.....	19
2.1.2 Dyrking av <i>Escherichia coli</i> -bakterier.....	19
2.1.3 Dyrking av bakteriofag M13.....	21
2.1.4 Håndtering av avfall fra bakteriekulturer.....	21
2.2 Arbeid med DNA.....	22
2.2.1 Plasmidisolering.....	22
2.2.2 Isolering av enkeltrådet DNA fra bakteriofag M13	24
2.2.3 Agarosegel-elektroforese av DNA.....	25
2.2.4 Kvantitering av DNA.....	26

2.2.5	Polymerase kjedereaksjon (PCR)	27
2.2.6	Kutting med restriksjonsenzym	28
2.2.7	Transformerings av kompetente celler	29
2.2.8	Mutagenese av DNA	30
2.3	Analyse av DNA-sekvens	33
2.3.1	DNA-sekvensering ved kjedetermineringsmetoden	33
2.3.2	Syklisk sekvensering i ALFexpress™	33
2.3.3	Automatisk sekvensering med ALFexpress™	34
2.3.4	Automatisk sekvensering med MegaBACE	37
2.4	Ekspresjon av rekombinante proteiner i <i>E.coli</i>	38
2.4.1	Ekspresjon og produksjon av cellefritt lysat	38
2.5	Rensing og oppkonsentrering av proteiner	39
2.5.1	Fjerning av DNA	39
2.5.2	Kromatografi av proteiner	40
2.6	Proteinbestemmelse ved Lowry-metoden	43
2.6.1	TCA-felling av proteinene	43
2.6.2	Lowry-analysen	43
2.7	SDS-PAGE (Polyakrylamidgelelektroforese):	44
2.7.1	Tillaging av geler til SDS-PAGE	44
2.7.2	Tillaging av prøver til SDS-PAGE	45
2.7.3	Comassie-farging av proteingeler	45
2.7.4	Sølvfarging av proteingeler	46
2.7.5	Tørring av proteingeler	46
2.8	Måling av polymeraseaktivitet	47
2.8.1	Fluorescensbasert polymerase-aktivitetsassay	47
2.8.2	Beregning av antall enzymenheter	48
3.0	Resultater	50
3.1	Mutagenese av Tma polymerase I	51
3.1.1	Oppdyrking av kloner E1T og D62T	51
3.1.2	Mutagenese	51
3.1.3	Kontrollsekvensering av genet	53
3.2	Ekspresjon av nativ og mutert Tma polymerase I	54
3.2.1	Ekspresjon og produksjon av grovlysat	54
3.2	Fluorescensbasert DNA polymeraseaktivitetsassay	55
3.2.1	Aktivitetsanalyse for den muterte polymerasen	55
3.2.2	Aktivitetsanalyse for den native polymerasen	57

3.3 Rensing av nativ og mutert polymerase.....	59
3.3.1 Fjerning av DNA ved hjelp av Streptomycinsulfat.....	59
3.3.2 Hydrofob interaksjonskromatografi.....	59
3.3.3 Ionebytterkromatografi	61
3.3.4 Gelfiltrering.....	64
3.4 Ny ekspresjon av nativ og mutert polymerase	65
3.5 Sekvensering med <i>Tma</i>- og <i>Tma</i> F730Y-polymerase på Alfexpress™	65
3.5.1 Bekreftelse av mutasjonen	65
3.5.2 Optimalisering av reaksjonsbetingelsene.....	67
3.5.3 Sammenligning av <i>Tma</i> polymerase og <i>Taq</i> polymerase	71
3.5.4 Sekvensering med <i>Tma</i> polymerase FY i MegaBACE-systemet	72
4.0 Diskusjon	76
4.1 Oppsummering av resultatene.....	76
4.2 Mutagenese av <i>Tma</i> polymerase I	77
4.3 Ekspresjon og isolering av rekombinante proteiner.....	77
4.3.1 Ekspresjon av nativ og mutert <i>Tma</i> polymerase I.....	77
4.3.2 Tillaging av grovlysat	78
4.4 Rensing av lysatene	79
4.4.1 Fjerning av DNA.....	80
4.4.2 Hydrofob interaksjonskromatografi.....	80
4.4.3 Ionebytterkromatografi	81
4.4.4 Gelfiltrering.....	82
4.5 Aktivitetsassay.....	82
4.6 Sekvensering med nativ og mutert <i>Tma</i> polymerase.....	84
4.6.1 Bekreftelse av mutasjonen	84
4.6.2 Optimalisering.....	84
4.6.3 Sammenligning av nativ <i>Tma</i> og <i>Taq</i> polymerase.....	85
4.6.4 Sammenligning av <i>Tma</i> polymerase FY og Thermosequenase.....	85
4.7 Videre arbeid.....	87
5.0 Materialer	88
5.1 Arbeid med mikroorganismer	88
5.2 Arbeid med DNA.....	88
5.2.1 isolering av plasmid	88
5.2.2 Agarose-gelelektroforese av DNA	89

5.3 Analyse av DNA-sekvens.....	89
5.3.1 Løsninger til bruk for nukleotidsekvensering på ALFexpress TM	89
5.3.2 Termineringsløsninger tilpasset <i>Taq</i> DNA polymerase FS	90
5.3.3 Termineringsløsninger tilpasset <i>Tma</i> polymerase FY	90
5.3.4 Termineringsløsninger tilpasset <i>Taq</i> polymerase	90
5.3.5 Termineringsløsninger tilpasset <i>Tma</i> polymerase	91
5.4 Ekspresjon av rekombinante proteiner	91
5.5 Rensing og oppkonsentrering av proteiner	92
5.5.1 Fjerning av DNA.....	92
5.5.2 Kromatografi av proteiner.....	92
5.6 Lowry-metoden	92
5.7 SDS-PAGE.....	93
5.7.1 tillaging av geler til SDS-PAGE	93
5.7.2 Tillaging av prøver til SDS-PAGE	93
5.7.3 Comassie-farging av geler etter SDS-PAGE:	94
5.7.4 sølvfarging av geler etter SDS-PAGE:	94
5.7.5 Tørring av proteingeler:	94
5.8 Polymerase-aktivitetsassay.....	94
5.9 Generelle løsninger og buffere.....	94
5.10 Formel benyttet under usikkerhetsregning.....	95
5.11 Kjemikalier og reagenser	96
5.12 Apparater og utstyr benyttet i oppgaven.....	97
Referanser	99

1.0 Innledning

1.1 DNA polymeraser

1.1.1 Hva er DNA polymeraser

DNA polymeraser er en gruppe enzymer som syntetiserer og reparerer DNA i cellen. For at celler skal kunne dele seg, må cellen ha en mekanisme for å replikere alt DNA i cellen, slik at de to dattercellene får hver sin kopi av arvematerialet. Noen av DNA polymerasene utfører dette, mens andre typer DNA polymeraser er involvert i reparasjon av DNA. Når DNA replikeres kan det forekomme feil, mutasjoner, i DNA. Hvis disse mutasjonene er skadelige for cellen er det viktig at feilen repareres, slik at den genetiske funksjonen kan opprettholdes. DNA polymeraser utfører sammen hjelpeproteiner både replikering og reparasjon av det genetiske materialet i cellene.

Mange av DNA polymerasene er også viktige verktøy i genteknologi. DNA polymeraser brukes blant annet i polymerase kjedereaksjon (PCR) og DNA-sekvensering. I disse metodene benytter man varmestabile DNA polymeraser som er stabile også ved temperaturer opptil 70-80°C. DNA polymerase I fra *Thermotoga Maritima*, som studeres i denne oppgaven, er en slik varmestabil DNA polymerase.

1.1.2 Inndeling av DNA polymeraser i ulike familier

De fleste celletyper, både eukaryote og prokaryote, inneholder flere ulike typer DNA polymeraser med ulike oppgaver i replikasjon, rekombinasjon og reparasjon av DNA i cellen. I selve replikasjonen bidrar også flere ulike polymeraser i de ulike prosessene; smelting av DNA-dupleksen ved replikasjonsorigo, elongering av "leading strand", elongering av "lagging strand", fjerning av RNA-primerne og korrekturlesing av nysyntetisert DNA. Disse ulike DNA polymerasene har utviklet seg og blitt spesialisert gjennom evolusjon. Dette gir grunnlaget for å dele de ulike DNA polymerasene inn i ulike familier, ettersom hvilken funksjon de har i cellen (Braithwaite *et al.*, 1993).

Den første DNA polymerasen som ble identifisert og isolert var DNA polymerase I fra *Escherichia coli* (Kornberg, *et al.* 1956 (1989)), og man antok at det var denne polymerasen som sto for replikasjonen av DNA i bakterien, noe som ble motbevist av senere eksperimenter på 70-tallet (Kornberg *et al.*, 1992). Dette førte til at man startet letingen etter flere DNA polymeraser i *E.coli*, og man fant DNA polymerase II og III (Kornberg, *et al.* 1970, Kornberg, *et al.* 1971, Kornberg *et al.*, 1992).

Etter hvert ble flere DNA polymeraser identifisert, isolert og karakterisert, og man forsøkte å dele disse polymerasene inn i ulike familier med utgangspunkt i DNA polymerase I, II og III fra *E.coli*. Familiene ble kalt familie A, B og C etter homologi med de tre genene *polA*, *polB* og *polC* i *E.coli*, som koder for henholdsvis DNA polymerase I, II og III (Braithwaite *et al.*, 1993).

Siden har det i tillegg blitt opprettet to nye familier av polymeraser. Den ene kalles familie X, og består av DNA polymeraser som viser homologi med den mammalske ikke-replikerende DNA polymerase β (Pelletier, *et al.* 1994)

Den andre familien kalles nå familie Y, eller UmuC/DinB familien (Gerlach *et al.*, 1999). Denne siste familien er blitt oppdaget i løpet av de siste årene og er en

superfamilie som ved dags dato består av over 30 ulike medlemmer. Denne nye familien omfatter alle enzymer som overfører nukleotider til hydroksyl akseptorgrupper. Det vil si enzymer som ulike DNA/RNA ligaser og primaser, og proteiner som er involvert i ulike aspekter ved transkripsjon, prosessering og replikasjon. Fellestrekket mellom disse enzymene er at de ofte er involvert i tilfeller der det har oppstått skade på templat-DNA, og de replikerer med lav fidelitet over det skadete området. Best kjent er vel SOS-responsen hos *E.coli* hvor tre proteiner, kodet av *umuC*, *umuD* og *dinB*, som alle er medlem i denne familien deltar (Friedberg, 2001, Sutton *et al.*, 2001).

Familie A DNA polymeraser:

Disse polymerasene er DNA-avhengige DNA polymeraser og består av en enkel polypeptidkjede på ca. 100 kDa. I tillegg til polymeraseaktivitet har de også 3'-5' og 5'-3' exonukleaseaktivitet. De fleste kommersielt benyttede enzymene tilhører i denne gruppen. Gruppen kan deles inn i fire undergrupper;

1. Bakterielle DNA polymeraser

- *E.coli* DNA polymerase I
- *Thermus aquaticus* DNA polymerase I
- *Thermotoga maritima* DNA polymerase I

2. Bakteriofag DNA polymeraser

- T7 DNA polymerase

3. Mitokondrielle DNA polymeraser

4. 5'til 3' exonukleaser med homolog sekvens til *E.coli* DNA polymerase I

Familie B DNA polymeraser:

Denne gruppen er også DNA-avhengige DNA polymeraser. Enzymene i denne gruppen består av en polypeptidkjede på ca. 90 kDa med assosierte subenheter på henholdsvis 27.5 og 10 kDa. Funksjonen til denne gruppen er noe uklar, men de har antakeligvis en funksjon i reparasjon av DNA.

1. Bakterielle DNA polymeraser

- *E.coli* DNA polymerase II

2. Bakteriofag DNA polymeraser

- T4 DNA polymerase

3. Archeabakterielle DNA polymeraser

- *Therococcus litoralis* DNA polymerase (Vent)

4. Eukaryote DNA polymeraser

- DNA polymerase alpha
- DNA polymerase delta
- DNA polymerase epsilon
- Andre eukaryote DNA polymeraser

5. Virale DNA polymeraser

- Herpes simplex virus type 1 DNA polymerase
- Epstein Barr virus DNA polymerase

Familie C DNA polymeraser:**1. Bakterielle replikative DNA polymeraser**

- *E.coli* DNA polymerase III α
- *Bacillus subtilis* DNA polymerase III

2. *E.coli* dnaQ (MutD)

- *E.coli* DNA polymerase III ϵ

Familie X DNA polymeraser:**1. Mammalske ikke-replikative DNA polymeraser**

- DNA polymerase β
- Terminal transferase

Familie Y DNA polymeraser:**1. Error-prone DNA polymeraser**

- Umu C protein (*E.coli*)
- DinB protein (*E.coli*)
- RAD30 protein (gjær)

(Braithwaite *et al.*, 1993)

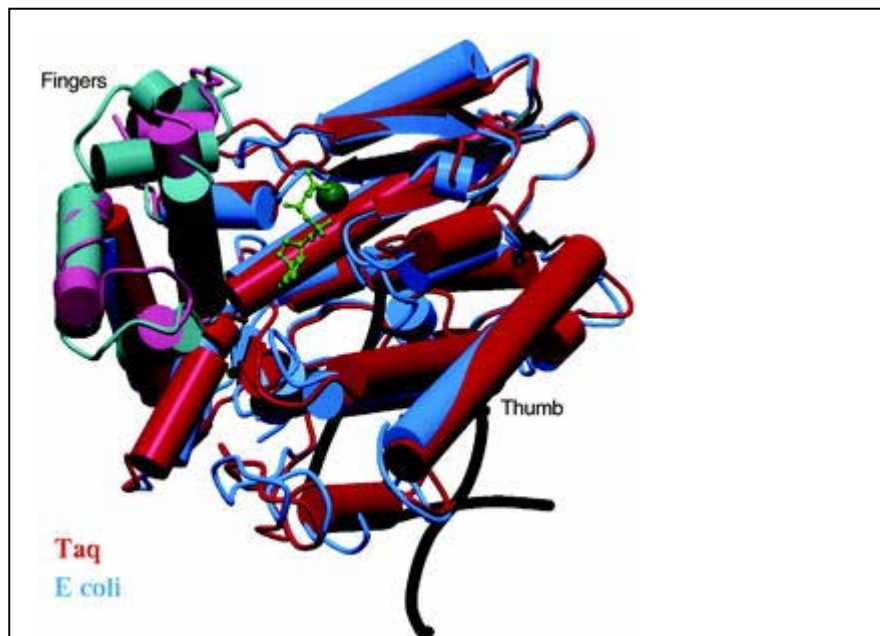
DNA polymerase I fra *Thermotoga maritima* (*Tma* polymerase) er en varmestabil polymerase som tilhører familie A, og har sekvenshomologi med *E.coli* DNA polymerase I.

1.1.3 Strukturen til familie A DNA polymeraser

Som tidligere nevnt var *E.coli* DNA polymerase I den første polymerasen som ble oppdaget, og dermed en av de polymerasene som er mest grundig studert. Studier av denne polymerasen og polymeraser i samme familie blir derfor ofte benyttet som prototyper i studier av strukturelle og biokjemiske mekanismer i replikasjon (Patel *et al.*, 2001).

E.coli polymerase tilhører som nevnt familie A. Flere polymeraser i denne familien har blitt studert, både med tanke på sekvens, struktur og mekanisme. I disse studiene har man blant annet funnet ut at enzymene i denne familien, på tross av miljødiversitet, er bemerkelsesverdig konserverte. Dette vises i studier der en polymerase fra en organisme, kan erstatte polymerasen i en annen organisme hvor polymeraseaktiviteten er fjernet. For eksempel kan DNA polymerase I fra *Thermus aquaticus* (*Taq* polymerase) erstatte DNA polymerase I i *E.coli*. Dette tyder på at DNA polymerase I har en lignende funksjon og benytter mye av de samme mekanismer i ulike organismer (Suzuki *et al.*, 1996).

I tillegg til dette, er krystallstrukturen til flere av proteinene kjent. Disse viser at selv om sekvensene er noe ulike, så har proteinene omtrent identisk tredimensjonal struktur. Dette kan ses ved å legge strukturene over hverandre, som på figur 1.1 (Patel, *et al.*, 2001).



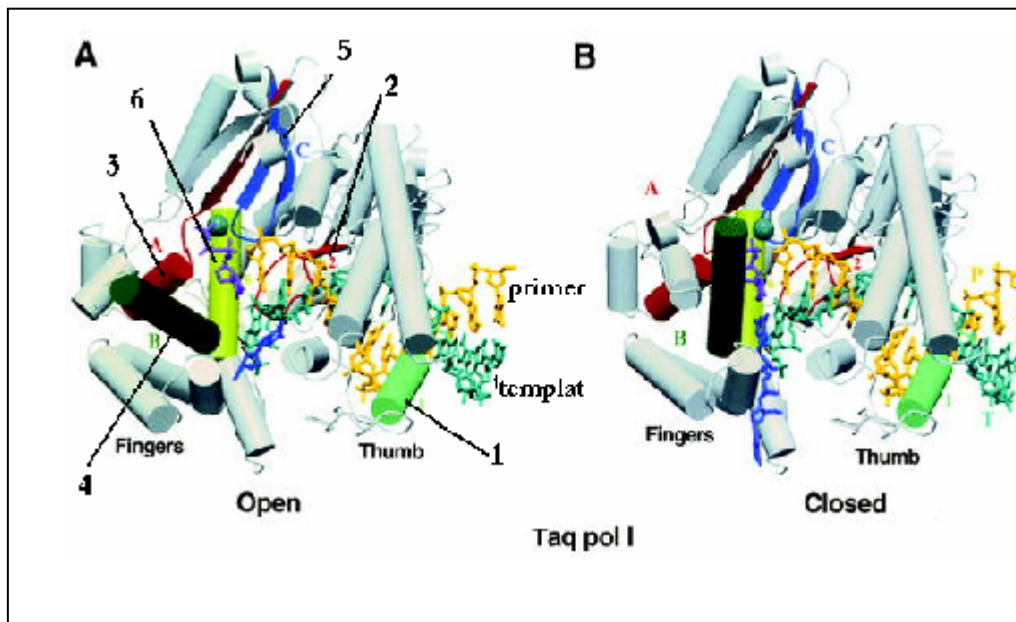
Figur 1.1: Strukturen av *Taq* DNA polymerase I (rød) (Li *et al.*, 1998) og *E.coli* DNA-polymerase I, Klenow fragmentet (blå) (Beesee *et al.*, 1993), lagt over hverandre. Figuren viser at på tross av sekvensulikheter og en stor, evolusjonær avstand, har de to enzymene nesten identisk folding (Patel *et al.*, 2001).

3D-strukturen ligner på en halvåpen høyreneve, med fingre som binder det innkommende nukleotidet, håndflate som inneholder katalytiske aminosyreresiduer og tommel som binder dobbelttrådig DNA (Patel *et al.*, 2001).

I tillegg til dette kan man ved sekvenssammenstilling av aminosyresekvensene til relaterte enzymer, identifisere konserverte regioner med felles katalytiske funksjoner. En slik sammenstilling av DNA polymerase I fra tre ulike organsimer, *Taq*-, *Bst*- og *T7*-polymerase, viser 6 slike konserverte regioner (Delarue *et al.*, 1990).

Alle disse konserverte regionene viser seg å ha betydelige roller i DNA-syntese. Aminosyreresiduen i region 1 er lokalisert på tuppen av tommeldomenet, og danner en helix-loop som interagerer med minor groove på dsDNA i det DNA-bindende trinnet. Residuene i region 2 sitter inne i håndflatedomenet, og interagerer med templattråden langs minor groove. Region 3, 4 og 5 ligner de mest konserverte områdene, motiv A, B og C, i mammalske polymeraser, og danner deler av det nukleotidebindende kløften i DNA polymerasens aktive sete. Region 3 og 5 (motiv A og C) er lokalisert i håndflatedomenet, mens region 4 (motiv B) er lokalisert i fingerdomenet.

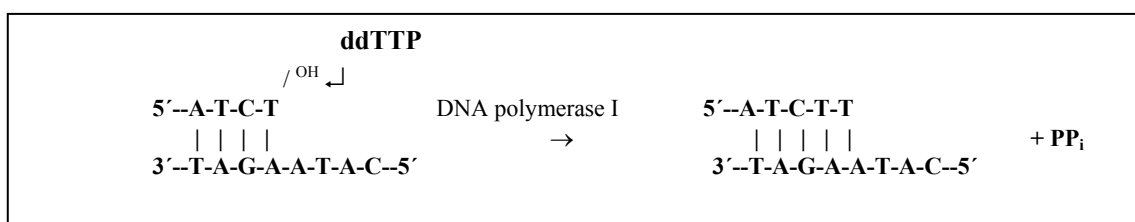
Region 6 interagerer med den første templatbasen, og gjør at denne kan "flippes" ut av helix-aksen med 90°, slik at den ikke kan baseparre med det innkommende nukleotidet (Patel *et al.*, 2001).



Figur 1.2: Figuren viser plasseringen til de seks konserverte områdene i *Taq* polymerase I, i åpen og lukket konformasjon. Region 1 (lys grønn) er lokalisert i tommeldomenet og interagerer med minor groove på DNA. Region 2 (oransje) er lokalisert i håndflatedomenet og holder templatet ved hjelp av interaksjoner nær minor groove. Region 3, også kalt motiv A (rød) interagerer med det innkommende divalent kation-dNTP komplekset. Region 4, eller motiv B (mørk grønn) interagerer også med det innkommende nukleotidet, men er lokalisert i fingerdomenet og endrer konformasjon i det nukleotidebindende trinnet slik at proteinet går over til en mer lukket form. Region 5/ motiv C (blå) sitter sammen med motiv A i håndflatedomenet. Disse to domenene inneholder de katalytisk essensielle karboksylholdige aminosyrene. Region 6 (grønn-gul) sitter i håndflatedomenet, og interagerer med templattråden nær stedet hvor basen "flippes" ut. Primer-tråden er vist i gult og templattråden i turkis (Patel *et al.*, 2001).

1.1.4 Funksjonene til familie A DNA polymeraser

1.1.4.1 Polymeraseaktiviteten

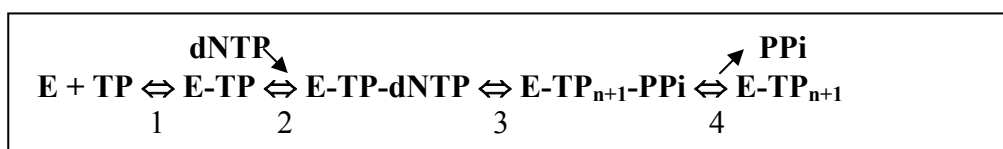


Figur 1.3: Polymeraseaktiviteten. Figuren viser inkorporering av deoksynukleotider i en voksende kjede av DNA. Den nye nukleotidet festes til den ledige 3'OH ved hjelp av DNA polymerase I og pyrofosfat spaltes av.

Under replikasjonen av DNA vil hver av de to DNA-trådene i "moder"-DNA fungere som templat i syntesen av en ny DNA-tråd. Polymerasen følger da reglene for Watson og Crick baseparring, når den inkorporerer neste nukleotid (Watson & Crick, 1953). Man sier derfor at replikasjonen er semi-konservativ fordi de to nye dsDNA etter replikasjonen består av en ny-syntetisert tråd og en gammel tråd. Syntesen av den nye DNA-tråden vil alltid starte ved et startpunkt hvor det dannes en løkke av "datter"-DNA. I begge ender dannes det replikasjongaffel, hvor DNA tvinnes ut og

replikeres ved hjelp av blant annet DNA polymerase. DNA-templatet avleses alltid i 3'-5'-retning, slik at syntesen av de nye trådene går i 5'-3'-retning. Dette gjør at bare den ene nye tråden kan syntetiseres sammenhengende, og denne blir kalt "leading strand". Den andre DNA-tråden syntetiseres som korte fragmenter, Okazaki-fragmenter. Denne kalles "lagging strand". DNA polymeraser må alltid ha en ledig 3'OH-gruppe hvor den kan feste det neste innkommende nukleotidet. Derfor er DNA polymerasene også avhengige av en primer. Med dette menes ett kort segment av en ny tråd som er festet til, og er komplementær til, templattråden. Denne primeren har en 3'OH-gruppe hvor DNA polymerasen kan feste til neste komplementære nukleotid. Denne primeren består av RNA og syntetiseres av RNA-polymerase eller av et enzym som kalles primase. På "lagging strand" sitter det en primer på hvert Okazaki-fragment. I *E.coli* fjernes primerne av 5'-3'-eksonukleasen i DNA polymerase I, som også erstatter RNA med DNA. Deretter blir fragmentene koblet sammen av DNA-ligase (Kornberg & Baker, 1992).

Etter studier av flere av medlemmene i familie A DNA polymeraser er det grunn til å anta at de benytter samme generelle mekanisme for addisjon av enkelt-nukleotider:



Figur 1.4: Fremstilling av den generelle mekanismen for nukleotid-inkorporering. E står for polymerasen, TP for templatprimer, dNTP for nukleotid og PPi for frigjort pyrofosfat (Patel *et al.*, 2001).

Polymeriseringen av DNA kan deles opp i flere trinn:

-Polymerasens binding til DNA

Det første trinnet i polymeriseringen er polymerasens binding til templatprimeren. Studier av ulike krystallstrukturer viser at tommeldomenet endrer konformasjon slik at det griper nesten fullstendig rundt DNA. Tommeldomenet roterer mot håndflatedomenet og de konserverte aminosyreresiduen som finnes på tuppen av tommeldomenet (region 1) roterer i motsatt retning i forhold til resten av tommeldomenet, slik at tuppen er i nærheten av DNA. Disse konformasjonsendringene resulterer i en 30 Å bred sylinder hvor de konserverte residuene "griper" DNA langs minor groove. Interaksjonene er primært langs sukkerfosfat-ryggraden på DNA og resulterer i at DNA får en S-formet konformasjon. Et andre sett med interaksjoner, hvor det enkeltrådige templatet interagerer med håndflatedomenet (region 2) bidrar også til at DNA endrer konformasjon. Ett tredje sett med interaksjoner fører til en 90° rotasjon av den første templatbasen, slik at denne er "flippet" på utsiden av DNA- heliks aksene og bort fra bindingssetet til det innkommende nukleotidet. Denne plassen okkuperes istedenfor av Tyr 671 (hos *Taq*), som danner hydrogenbindinger med det innkommende nukleotidet. Disse interaksjonene og konformasjonsendringene er observert i flere ulike polymeraser fra familie A, blant annet *Taq* pol I, *Bst* pol I, T7 pol og HIV-1 RT, og dette kan tyde på at dette er en mekanisme som også benyttes av de andre medlemmene i denne familien (Patel *et al.*, 2001).

-Binding av nukleotidet

Når nukleotidet bindes til polymerasen skjer nok en konformasjonsendring. Dette er vist i krystallstrukturer av blant annet *Taq* Pol I bundet til DNA i nærvær av ett innkommende nukleotid (Li *et al.*, 1998). I dette trinnet skjer det minst tre endringer i enzymet;

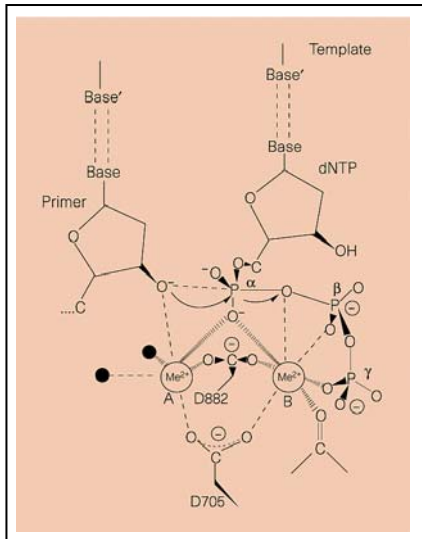
- strukturelle elementer i fingerdomenet roterer mot 3'enden på primeren, slik at strukturen blir mer lukket, og omslutter det innkommende nukleotidet.

- templatbasen roterer tilbake inn i helix-aksen ($\geq 90^\circ$)

- basedelen av det innkommende nukleotidet danner et Watson-Crick basepar med templatbasen, og trifosfatdelen danner metallmedierte ioniske interaksjoner med aminosyreresiduer i det aktive setet. Disse konformasjonsendringene fører til at base- og riboseden av nukleotidet omslutes av en hydrofob lomme, som følge av interaksjon med Phe667, Tyr671, Ile614 og Glu615. (Tallene henspiller til *Taq* pol I), mens den negative trifosfatdelen interagerer med to basiske aminosyrer i motiv B og to sure aminosyrer i motiv A og C noe som bidrar til å stabilisere transisjonsstadiet (Patel *et al.* 2001, Shinkai *et al.*, 2001). Dette følger en induced-fit modell for nukleotid-inkorporering, og bidrar også til økt spesifisitet for korrekte basepar. Dette er fordi ett ukorrekt basepar ikke vil innta samme geometriske form som det korrekte baseparet. Dette vil igjen føre til at 3'OH-gruppen vil bli feilplassert og dermed hindre inkorporering av neste nukleotid. Dette er vist ved blant annet mutasjoner av residuer som bidrar i interaksjonene i Klenow-fragmentet fra *E.coli*. Det ble da vist at mutasjoner i disse residuene fører til nedsatt fidelitet hos polymerasen (Polesky *et al.*, 1990, Carroll *et al.*, 1991).

-Nukleofilt angrep

Det katalytiske setet hos diverse DNA polymeraser består av tre sure aminosyrer med karboksylat-sidekjeder (Asp610, Asp785 og Glu786 hos *Taq*). Strukturer viser at to av karboksylat-sidekjedene binder to metallioner (Sousa, 1996, Shinkai *et al.*, 2001). Rollen til den tredje aminosyren er uklar. Begge metallionene er oktahedrisk koordinert og har seks ligander. Metallion A er koordinert av 3'OH på primertråden, α -fosfatet på det innkommende nukleotidet, oksygenatomer på de to aspartat-sidekjedene og to vannmolekyler. Metallion B er koordinert av α -, β - og γ -fosfatet på det innkommende nukleotidet, karboksylat-sidekjeden på de to Asp-residuene og en karbonylgruppe fra en tyrosin som er naboresidu til den ene Asp-residuen (Tyr611 hos *Taq*). De to metallionene kan være Mg^{2+} , Mn^{2+} eller Zn^{2+} , men Mg^{2+} er mest vanlig. Ved polymerisering reagerer metallion A (se figur 1.5) både α -fosfatet og med 3'OH på primertråden. Antakeligvis bidrar dette til å øke den elektropositive karakteren til fosfatet i tillegg til at det bidrar til deprotonering av 3'OH, slik at den igjen kan utføre et nukleofilt angrep på α -fosfatet på det innkommende nukleotidet (Steitz, 1998).



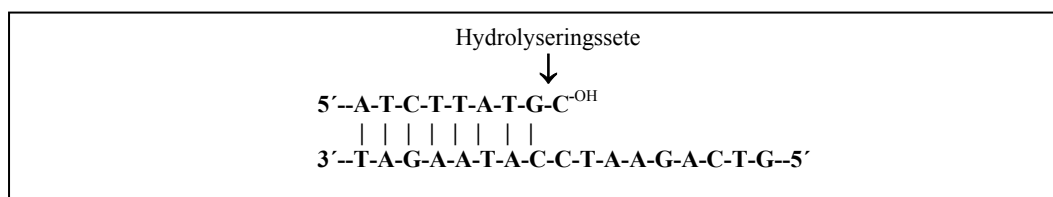
Figur 1.5: Figuren viser de to metallionene som er forankret i det aktive setet på polymerasen. (Steitz, 1998).

-Frigjøring av pyrofosfat og translokasjon

Etter at baseparringen er komplett og det nye nukleotidet er festet til den voksende kjeden av DNA, må pyrofosfatet, det vil si β - og γ -fosfatet, frigjøres. Strukturstudier tyder på at etter at nukleotidet er inkorporert, inntar polymerasen en mer åpen konformasjon igjen, translokerer til neste templatposisjon og frigjør pyrofosfat før neste nukleotid-inkorporering (Patel, *et al.*, 2001).

I studier av *E.coli* i åpen og lukket konformasjon kan det se ut som om PP_i er i kompleks med to konserverte residuer i O-helixen, en Arg og en Lys. I lukket konformasjon er PP_i i tillegg i kompleks med to Asp-residuer i motiv A. Når polymerasen da går fra lukket til åpen konformasjon kan de to residuene på O-helixen (Lys og Arg) bidra til å fjerne PP_i fra det katalytiske setet. Deretter kan polymerasen translokeres til neste templatposisjon. Polymerasen kan bevege seg relativt fritt bortover DNA, grunnet at interaksjonene mellom polymerasen og DNA er ikke-spesifikke interaksjoner mellom aminosyreresiduer og sukker-fosfat-rygggraden hos DNA (Patel, *et al.*, 2001).

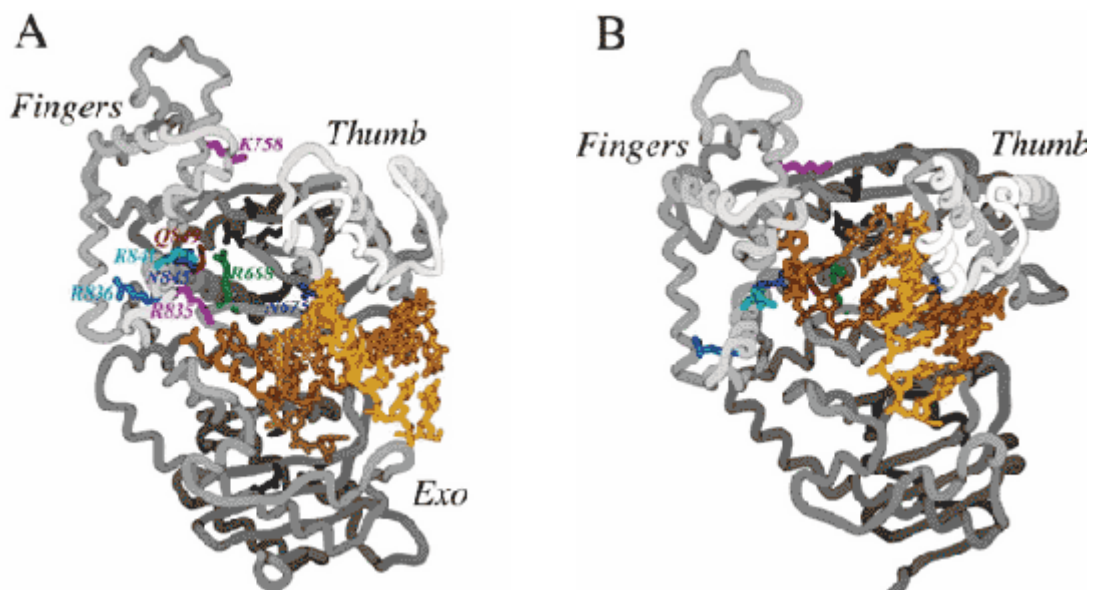
1.1.4.2 3'-5'-eksonukleaseaktiviteten



Figur 1.6: 3'-5'-eksonukleaseaktiviteten. 3'-5'-eksonukleasen i DNA polymerase I fjerner uparrede nukleotider fra den voksende DNA-kjeden.

Denne aktiviteten fungerer som en korrekturleser og går i motsatt retning av selve DNA-syntesen. Hvis polymerasen setter inn ett feil nukleotid vil denne ikke baseparre med templatnukleotidet. Dette vil da detekteres av visse konserverte residuer i polymerasedomenet. Mekanismen for denne detekteringen av galt parrede nukleotider er ikke helt klar, men mye tyder på at noen av residuene i polymerase-setet danner stabiliserende hydrogen-interaksjoner med korrekte basepar. Disse interaksjonene vil ikke kunne finne sted ved en mismatch fordi hydrogen-

bindingsakkseptorene da ville være feil plassert i forhold til disse residuene. Noen mismatchede basepar f.eks. G-A og G-T kan allikevel ha en viss stabilitet fordi de har lignende geometri som A-T og G-C (Sloane *et al.*, 1988). Andre residuer i polymerasedomenet fungerer ved å diskriminere mot binding av en feil baseparret primer terminus til det aktive setet i polymerasedomenet. Etter at ett nukleotid har blitt feilinkorporert, så vil raten til fortsatt elongering synke. Det at raten synker gjør at DNA-tråden kan bli forflyttet til eksonukleasetet, slik at det feilinkorporerte nukleotidet kan kuttes vekk før elongeringen fortsetter (Kunkel *et al.*, 2000). Det som skjer er antakeligvis at de tre til fire siste baseparrene blir smeltet slik at den enkelt-trådige DNA-enden kan overføres til eksonukleasetet. Her kuttes det gale nukleotidet vekk, mens dupleks-DNA fortsatt er bundet til den polymerase-bindende kløften i polymerasedomenet (Freemont *et al.*, 1988). Overføring av primer terminus fra polymerase-setet til eksonukleasetet kan være et resultat av økt smeltekapasitet hos DNA med mismatch og/eller et resultat av at DNA med mismatch binder svakere til polymerase-setet (Brenowitz *et al.*, 1991). Figuren nedenfor viser strukturen til Klenow-fragmentet til *E.coli* og det store fragmentet til *Bst* polymerase med DNA bundet til henholdsvis eksonukleasetet og polymerase-setet (Thompson *et al.*, 2002).



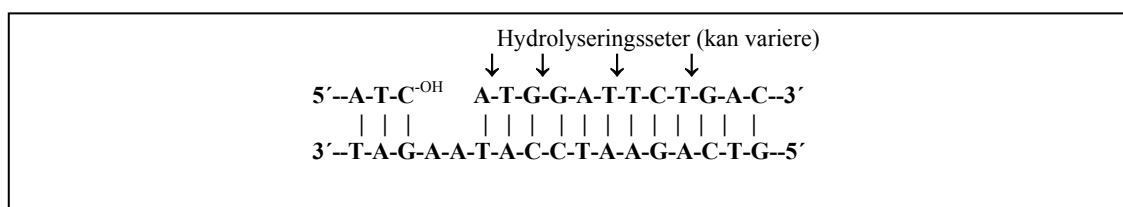
Figur 1.7: Sammenligning av to strukturer med dupleks-DNA bundet i henholdsvis eksonukleasetet og polymerase-setet. **Figur A** viser DNA bundet til eksonukleasetet til Klenow-fragmentet fra *E.coli*. **Figur B** viser dupleks-DNA bundet til polymerase-setet til *Bst* polymerase. Begge figurene er sett ovenfra den polymerase-bindende kløften. DNA er farget i lys og mørk oransje. Karboksylat-sidekjedene i både eksonukleasetet i Klenow og polymerase-setet er farget med svart (Thompson *et al.*, 2002).

I likhet med polymerasen benytter også eksonukleasen en to-metallion-mekanisme i katalysen. De to metallionene er bundet til konserverte sure residuer i det aktive setet. Det ene metallionet er bundet til karboksylgruppen til Asp355, Glu357 og Asp501, mens 5'fosfatet i dNMP er den fjerde liganden og et vannmolekyl er en femte ligand.

Det andre metallionet er bundet til Asp355, to av 5'fosfat-gruppene og tre vannmolekyler som igjen er bundet til Asp424 (tallene henspiller til DNA polymerase I fra *E.coli*). De fleste residuene i det aktive setet i 3'-5'-eksonukleasen er meget konserverv i andre prokaryote og eukaryote polymeraser, slik at det er sannsynlig at disse bruker samme mekanisme som DNA polymerase I fra *E.coli* (Beese *et al.*, 1991). Etter at de siste baseparrene på DNA-enden er blitt smeltet, blir det dannet et kompleks mellom ssDNA og residuer i eksonukleasen. De tre siste nukleotidene på 3'enden på ssDNA passer inn i en hydrofob lomme som inneholder de to divalente kationene. Nukleotidene bindes til enzymet ved hjelp av hydrofobe interaksjoner og hydrogenbindinger som er uavhengig av basens identitet (Beese *et al.*, 1991).

Ved hydrolyse av DNA vil antakeligvis Metallion A bidra til dannelse av et nukleofilt hydroksidion, som angriper fosfatgruppen på nukleotidet slik at bindingen brytes og nukleotidet frigjøres. Metallion B bidrar muligens til stabilisering av et pentakovalent mellomprodukt og til frigjøring av 3'oxy-anionet (Derbyshire *et al.*, 1991, Beese *et al.*, 1991, Freemont *et al.*, 1988).

1.1.4.3 5'-3'-eksonukleaseaktiviteten



Figur 1.8: 5'-3'-eksonukleaseaktiviteten. Figuren viser mulige hydroliseringssteder for 5'-3'-eksonukleaseaktiviteten som fjerner baseparrede nukleotider i front av den voksende DNA-kjeden.

Den siste enzymaktiviteten som polymerase I inneholder er en 5'-3'-eksonuklease. Denne er kjent for å være en strukturspesifikk nuklease, som kløyver en 5' forskjøvet tråd ved overgangen mellom enkelttrådig og dobbelttrådig regioner. Kløyving skjer da vanligvis mellom de to første parrede basene ved overgangen. Studier viser også at foretrukket substrat for bakterielle 5' nukleaser har en enkel uparret base på 3'enden på primeren som sitter oppstrøms for kløyvingsstedet (Xu *et al.*, 2001)

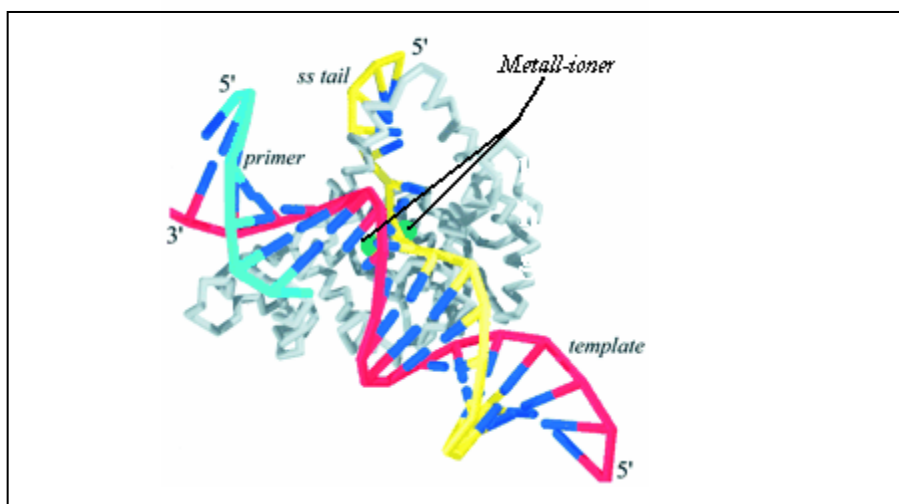
5'-3'-eksonukleasen samarbeider med polymerasen om å reparere DNA i "excision repair" og i fjerning av RNA-primerne fra Okazaki-fragmentene under syntese av "lagging strand". Dette samarbeidet ser ut til å foregå uten noen form for fysisk kontakt mellom 5'-3'-eksonuklease-domenet og polymerasedomenet (Setlow *et al.*, 1972).

En fri 5'ende er helt nødvendig for at nukleasen skal binde seg til DNA. Dette sørger for at nukleasen kun kutter i korrekte substrater dannet ved "lagging strand" replikasjon, DNA-reparasjon eller rekombinasjon, og forhindrer kutting på feil substrater som for eksempel ved replikasjonsgaffelen (Xu *et al.*, 1997).

Når det gjelder mekanismen i kuttingen er denne noe uklar, men mye tyder på at også denne aktiviteten benytter seg av metallioner i katalysen. Ved en sammenstilling av sekvensene til flere 5'-3'-eksonukleaser fra ulike organismer, både prokaryote og eukaryote, fant man 6 konserverte regioner. Innen disse regionene fant man 14 aminosyrer som var identiske hos alle, deriblant 10 med karboksylgrupper som kan fungere som ligander for eventuell metallioner (Gutman *et al.*, 1993).

Krystallstrukturer av T5 5' nuklease (Ceska *et al.*, 1996) og *Taq* DNA polymerase (Kim *et al.*, 1995) støtter denne teorien. Her kan man se at nukleasens aktive sete

består av en gruppe med karboksylat-residuer som koordinerer metallion-ligandene som er essensielle for den katalytiske aktiviteten. Antallet metallion-ligander og de ulike karboksylat-residuenes rolle er ikke helt klar og kan muligens variere fra art til art, eller ettersom hva slags substrat nukleasen har. I alle tilfelle har noen av de konserverte residuene som funksjon å binde til DNA, mens andre binder til metallioner. Metallionene er involvert i å danne et hydroksidion som angriper fosfodiester-bindingen, og i stabilisering av "leaving"-gruppen og den pentavalente transisjonstilstanden som dannes under reaksjonen (Xu *et al.*, 1997, Amblar *et al.*, 2001, Xu *et al.*, 2001).



Figur 1.9: Hypotetisk modell av T5 5' nuklease bundet til DNA med enkel 5' ende. De to grønne kulene representerer to divalente metallioner som er bundet til det aktive setet. (Xu *et al.*, 2001).

1.1.4.4 Diskriminering mot dideoksynukleotider

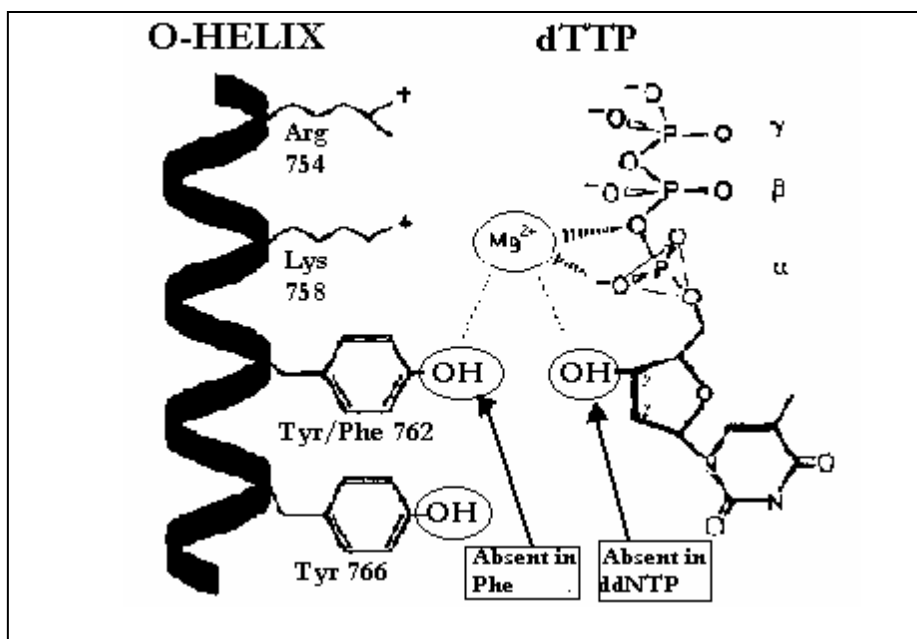
Flere DNA polymeraser blir benyttet i sekvensering. I nukleotidesekvensering benytter man gjerne Sangers metode. Denne metoden baserer seg på inkorporering av dideoksynukleotider, etterfulgt av kjedeterminering (Sanger *et al.*, 1977). Metoden er nærmere beskrevet under kap. 2.3.

Forskjellen på ett deoksynukleotid (dNTP), som er polymerasens normale substrat, og ett dideoksynukleotid (ddNTP), er at mens dNTP mangler 2'OH-gruppen, mangler ddNTP OH-gruppen på både 2'karbonet og 3'karbonet i riboseringen. Ved inkorporering av en ddNTP vil elongeringen stoppe opp fordi 3'OH er nødvendig for å danne en fosfodiesterbinding med neste nukleotid (Sanger *et al.*, 1977).

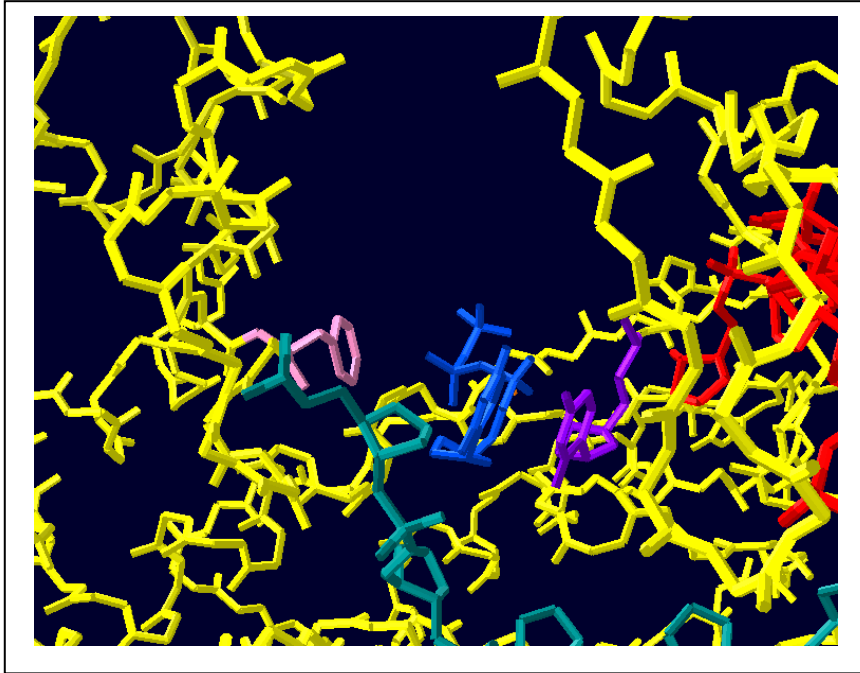
Det er observert at flere polymeraser, blant annet *E.coli* polymerase I og *Taq* polymerase, i stor grad diskriminerer mot inkorporering av ddNTP. Dette fører til at man må ha relativt høye konsentrasjoner av ddNTP i forhold til dNTP i reaksjonsblandingen, noe som ikke er gunstig for sekvenseringsresultatet. Andre polymeraser, som T7 polymerase, diskriminerer i liten grad mot ddNTP (Tabor *et al.*, 1995).

Ved *in vitro* mutagenese ble det funnet ut at ved å bytte ut fenylalanin i posisjon 762 hos *E.coli* med tyrosin, ble diskrimineringen mot ddNTP redusert. Denne mutasjonen er også utført på *Taq* polymerase med samme resultat. Når krystallstrukturen av komplekset mellom *E.coli* DNA polymerase I og dCTP ble studert, viste det seg at denne residuen (Phe 762), som er lokalisert på O-helixen, er den residuen som sitter nærmest 3'OH på det innkommende dCTP. Dette tyder på at

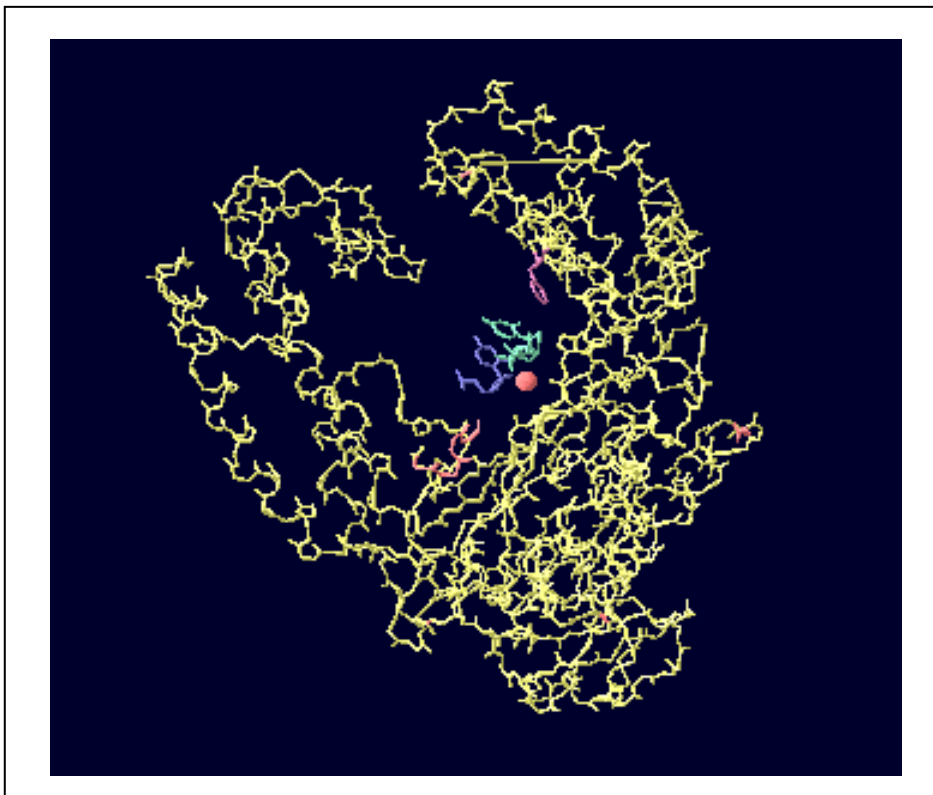
mekanismen bak diskrimineringen er at det er nødvendig med en OH-gruppe som kan være med på å stabilisere bindingen til metallionet som deltar i den katalytiske reaksjonen. Denne OH-gruppen kan komme fra det innkommende nukleotidet, eller fra en residu på polymerasen. Fenylalanin som sitter på denne posisjonen har ingen OH-gruppe som kan delta i denne reaksjonen. Hvis det innkommende nukleotidet er en ddNTP mangler også denne en 3'OH som kan delta i reaksjonen. Dette fører til at dNTP som har denne 3'OH-gruppen foretrekkes over ddNTP hos polymeraser som mangler en OH-gruppe i denne posisjonen. T7 polymerase som ikke diskriminerer mot ddNTP har en tyrosin i tilsvarende posisjon, og har dermed alltid en OH-gruppe som kan bidra i reaksjonen (Tabor *et al.*, 1995). Se figur 1.10.



Figur 1.10: Modell som viser en mulig mekanisme for diskriminering mot ddNTP. Til venstre ser man O-helixa til *E. coli* pol I og til høyre ser man dTTP (Tabor *et al.*, 1995).



Figur 1.11: Modell av det aktive setet hos *Taq* polymerase. Phe 667 (tilsvarer Phe 762 i *E.coli* og Phe 730 hos *Tma* pol.) er vist i rosa, ddCTP i blått og lilla, og to oligonukleotider i grønt og rødt. Modellert etter struktur av det store fragmentet av *Taq* polymerase I (Li *et al.*, 1998).



Figur 1.12: Modell av DNA polymerase I fra *Thermotoga Maritima*, modellert etter *Taq* polymerase. Phe 730 er markert rosa, man ser to dideoksynukleotider i blått og grønt, og et magnesiumion i oransje. Modellert etter struktur av det store fragmentet av *Taq* polymerase I (Li *et al.*, 1998).

1.2 DNA polymeraser i genteknologi

I tillegg til sin meget betydelige rolle i cellen, har DNA polymeraser etter hvert blitt uunnværlige verktøy i genteknologi (Hamilton *et al.*, 2001). DNA polymerasene, og da særlig de varmestabile, blir benyttet i en rekke ulike teknikker, som i PCR og i DNA-sekvensering. Det er flere egenskaper som avgjør om en DNA polymerase er egnet til bruk i genteknologiske metoder.

1.2.1 Ønskede egenskaper hos polymeraser ved bruk i PCR

PCR er en teknikk som benyttes for å amplifisere DNA. Metoden er basert på at DNA polymerasen forlenger to spesifikke primere som er komplementære til de flankerende sekvensene til mål-DNA. Amplifiseringen skjer i en repeterende syklus hvor DNA denatureres ved oppvarming til 95°C, primerne fester seg og det skjer en elongering av primerne (Saiki *et al.*, 1985). Ønskede egenskaper hos polymerasen er:

-Varmestabilitet:

Både i sekvensering og i PCR benyttes det høye temperaturer for å denaturere DNA som skal sekvenseres/amplifiseres. Det er da helt nødvendig at polymerasen som benyttes er varmestabil, det vil si at den tåler relativt høye temperaturer uten at den blir denaturert. Hvis man ikke benytter en varmestabil polymerase må man tilsette ny polymerase i hver syklus, da den vil bli ødelagt i denatureringstrinnet (Saiki *et al.*, 1988). Proteinene fra varmestabile bakterier stabiliseres tilsynelatende av flere faktorer. For det første har de ofte en sterkere hydrofob kjerne enn homologe, mesofile proteiner. Dette kan man se ved at de har et høyere innhold av hydrofobe residuer med forgrenete sidekjeder. For det andre har de ofte mindre løkker og andre sekundærstrukturer på overflaten, noe som gjør dem mer stabile. De er også ofte kortere enn vanlige proteiner, noe som fører til en høyere smeltetemperatur. Og sist, men ikke minst, har disse proteinene ofte et høyt innhold av ladete residuer, på bekostning av nøytrale residuer. Dette fører til flere elektrostatiske interaksjoner inne i proteinet. Flere studier tyder på at saltbroer er den viktigste stabiliserende faktoren hos disse varmestabile proteinene (Kumar *et al.*, 2001, Karshikoff *et al.*, 2001). Slike varmestabile polymeraser finner man hos bakterier som lever ved høye temperaturer, såkalte termofile bakterier. *Thermotoga maritima* er en slik bakterie.

-Prosessivitet:

Prosessiviteten angir hvor mye av DNA-molekylet som blir syntetisert før polymerasen dissosieres fra templatet, og det skjer en kjedeterminering. Høy prosessivitet hos polymerasen vil gi en mer effektiv syntese av lange produkter. Nåværende studier har avdekket to ulike mekanismer som bidrar til prosessivitet. Den ene finner man hos de fleste replikative polymeraser, replikaser, som for eksempel replikasen hos bakteriofag T4. Denne mekanismen involverer ett ringformet protein, "DNA sliding clamp", som omslutter DNA og binder samtidig til den katalytiske enheten på polymerasen slik at de to holdes sammen (Kelman *et al.*, 1998).

En annen mekanisme har blitt oppdaget hos T7 replikasen. Denne polymerasen har vanligvis lav prosessivitet, og blir først prosessiv etter at den assosieres med et vertskodet protein; tioredoxin. Dette proteinet binder til polymerasen i tommelregionen, hvor T7 har 71 ekstra aminosyrer mellom heliks H og H1, og danner sannsynligvis en klemme rundt DNA. Det er vist at flere polymeraser, blant annet T3

polymerase, også inneholder slike regioner som kan binde thioeredoksin. Det er også vist at flere eukaryote polymeraser assosierer med mindre proteiner for å bli prosessive enzymer (Kelman *et al.*, 1998).

-Fidelitet og korrekturlesing i PCR:

Når man amplifiserer DNA er det en fordel at produktet ikke inneholder mutasjoner. Fidelitet angir polymerasens evne til å skille mellom korrekt og ikke korrekt substrat, det vil si evnen til å inkorporere rett nukleotid i forhold til templatet (Showalter *et al.*, 2002).

Skulle polymerasen inkorporere feil nukleotid, er det viktig at polymerasen har 3'-5'eksonukleaseaktivitet, eller korrekturlesingsaktivitet. Denne aktiviteten sørger for at det gale nukleotidet kuttet vekk, slik at det korrekte kan settes inn (Freemont *et al.*, 1988).

1.2.2 Ønskede egenskaper hos polymeraser ved bruk i sekvensering

Sekvensering av DNA er en metode som benyttes i mange ulike formål. Metodene som benyttes har sitt utspring i Sangers kjedetermineringsmetode. I denne metoden blir enkeltrådig DNA kopiert i en løsning som inneholder dideoksynukleotider. Dideoksynukleotidene fører til kjedeterminering når de inkorporeres fordi de mangler 3'OH gruppen som benyttes i fosfodiesterbindingen (Sanger *et al.*, 1977). Detektering av terminerte produkter gjøres ved merking med radioaktivitet etterfulgt av autoradiografi (Sanger *et al.*, 1977) eller ved fluorescensmerking. Sistnevnte metode brukes i automatisert sekvensering (Smith *et al.*, 1986, Prober *et al.*, 1987).

Også i sekvensering er det ønskelig med polymeraser som er **varmestabile** og har **høy prosessivitet**. I tillegg er det viktig med evne til å akseptere nukleotideanaloger og med lav eksonukleaseaktivitet.

-Evne til å akseptere nukleotideanaloger: I sekvensering er det viktig at polymerasen ikke diskriminerer for mye med hensyn på nukleotideanaloger, som for eksempel dideoksynukleotider som benyttes i Sanger sekvensering. En del polymeraser har liten evne til å inkorporere slike modifiserte nukleotider, noe som fører til at man må bruke høye ddNTP-konsentrasjoner i forhold til dNTP. Dette kan føre til at man får sekvensdata som er vanskelige å tolke (Astatke *et al.*, 1998).

-Lav eksonukleaseaktivitet:

Hos polymeraser som benyttes i sekvensering kan eksonukleaseaktiviteten hos enzymet virke ødeleggende når man benytter kjedetermineringsmetoden. 5'-3'eksonukleasen er et problem fordi den kan fjerne nukleotider fra 5'enden av den terminerte tråden. Hvis tråden er merket i 5'enden, skaper dette et problem fordi merkingen da vil forsvinne. 3'5'-eksonukleasen er et mindre problem, men kan virke forstyrrende hvis den fjerner innsatte nukleotideanaloger og dermed hindre kjedeterminering (Hamilton *et al.*, 2001).

1.2.3 Forbedringer av polymeraser ved *in vitro* mutagenese

Flere DNA polymeraser fra familie A har blitt modifisert ved *in vitro* mutagenese for å bli bedre egnet for genteknologiske metoder. Et eksempel er fjerning av det N-terminale området på DNA polymerase I fra *E.coli*. I dette området sitter 5'-3'eksonukleasen. Denne polymerasen uten det N-terminale området kalles Klenow fragmentet (Klenow *et al.*, 1970).

Et annet eksempel er modifisering av *Taq* polymerase for å gjøre den til ett bedre sekvenseringsenzym. En punktmutasjon (F667Y) fører til at enzymet får økt evne til å akseptere dideoksynukleotider og andre nukleotideanaloger (Tabor & Richardson, 1995).

En annen vanlig modifisering hos sekvenseringsenzym er å inaktivere eller redusere 3'-5'eksonukleaseaktiviteten (Tabor *et al.*, 1989).

1.3 DNA polymerase I fra *Thermotoga maritima*

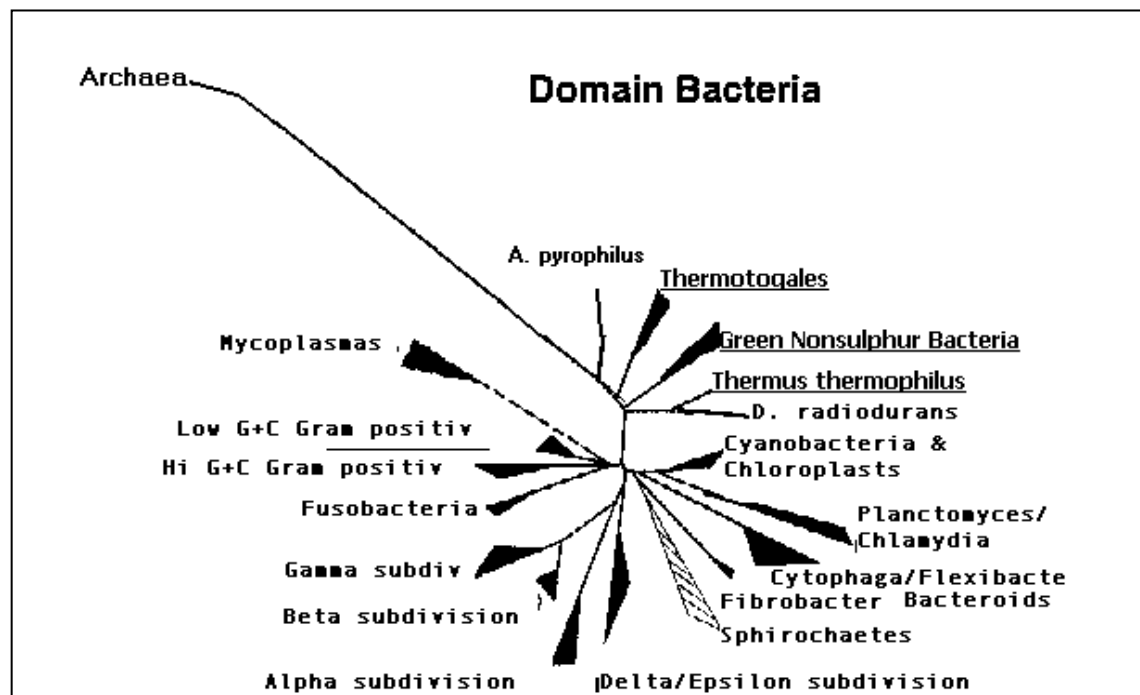
1.3.1 *Thermotoga maritima*

Thermotoga maritima er en såkalt hypertermofil eubakterie, som tilhører familien Thermotogales. Dette er en familie med mikroorganismer som lever ved ekstremt høye temperaturer. Bakterien ble først isolert fra geotermalt oppvarmet marint sediment i Vulcano i Italia. *Thermotoga maritima* vokser ved temperaturer mellom 55 og 90°C, med et temperaturoptimum på 80°C. Dette gjør *Thermotoga maritima* til en av de mest termofile bakteriene som er kjent i dag. *Thermotoga maritima* er en anaerob, gram-negativ, stavformet bakterie, som vanligvis vokser enkeltvis eller i par. Bakteriene er omgitt av en karakteristisk lagvis struktur (toga). Celleveggen er laget av murein, noe som gjør at bakterien er sensitiv for lysozym (Huang *et al.*, 1998).

1.3.2 Evolusjon

Når man ser på fylogenetiske undersøkelser basert på 16S rRNA og elongeringsfaktorene EF-Tu og EF-GC indikerer disse at *Thermotoga*, muligens sammen med *Aquifex* er de tidligste og kanskje de grenene som utvikler seg mest langsomt i bakterie-omenet. Men undersøkelser gjort ved hjelp av andre gener, og ved hjelp av hele genomet strider i mot dette. Ved undersøkelse av hele genomet fant man ut at *Thermotoga maritima* er den eubakterien som ligner mest på Archea-familien. Hele 51 % av genene ligner mest på gener fra Archea-familien. I kontrast er det kun 16 % av genene hos *A. aeolicus* og 7 % av genene hos *B. subtilis* som ligner mest på gener fra Archea-familien. Dette betyr ikke nødvendigvis at *Thermotoga maritima* er i nærmere slektskap til archea-familien enn andre eubakterier. Disse likhetene kan ha oppstått på flere ulike måter. Disse genene kan ha blitt mistet hos andre eubakterier, men ikke hos *Thermotoga maritima*. Det kan også komme av at *Thermotoga maritima* kan ha hatt et fåtall gener som har lignet på gener hos Archea-familien, og at disse genene etter hvert har utvidet seg til å bli store gen-familier. En tredje forklaring på likhetene er at det har forgått en lateral gen-overføring mellom disse to. Noe som støtter denne teorien er at de fleste felles genene er gener som koder for spesialtilpasninger, som ulike transportproteiner. Gener som derimot koder for såkalte "housekeeping" proteiner hos *Thermotoga*

maritima har størst likhet med andre eubakterier. Ett annet bevis for denne teorien er at 81 av de Archea-lignende genene i *Thermotoga maritima* er samlet i 15 regioner på kromosomet, og i 7 av disse områdene er gen-rekkefølgen lik som i Archea (Nelson *et al.*, 1999). Nyere studier som involverer fylogenetisk analyse av genene til 8 ribosomale proteiner, to elongeringsfaktorer og to RNA-subenheter støtter teorien om at *Thermotoga maritima* og *Aquifex pyrophilus* allikevel er en tidlig gren i evolusjonen, og at slektskapet mellom *Thermotoga* og Archea kommer av lateral gen-overføring. Et eksempel på et fylogenetisk tre over bakterie-domenet vil da se slik ut:



Figur 1.13: Fylogenetisk tre over det bakterielle domenet. Treet er fremstilt ved hjelp av data fra 16S rRNA gen sekvenser (Siefert *et al.*, 1998).

1.3.3 *Tma* polymerase I

DNA polymerase I fra *Thermotoga maritima* er et varmestabilt protein. Det har en størrelse på 97 kDa, bestemt ved gel-elektroforese (102 kDa ut i fra nukleotid-sekvens). I tillegg til DNA polymeraseaktivitet har enzymet 3'-5'eksonuklease-aktivitet, 5'-3'eksonukleaseaktivitet og revers transkriptaseaktivitet.

Ved ekspresjon av enzymet i *E.coli* er det observert at det blir uttrykt en forkortet versjon av polymerasen. I denne varianten har translasjonen startet ved Met-kodonet ved posisjon 140. Enzymet har da en molekylvekt på 86 kDa, og har nedsatt 5'-3'eksonuukleaseaktivitet. Det er også mulig å uttrykke et rekombinant protein som starter ved posisjon 283. Dette enzymet vil da ha en molekylvekt på 70 kDa, har nedsatt 5'-3'eksonuukleaseaktivitet, og er mer termostabil enn den native varianten. (Gelfand *et al.*, U.S. patentskrift, 1995).

Sekvensen til DNA polymerase I fra *Thermotoga maritima* viser likheter med sekvensene fra DNA polymerase I fra *Thermus aquaticus* og *Thermus thermophilus*, men disse mangler 3'-5'eksonukleaseaktivitet. Det er en klar fordel om enzymer som skal benyttes i PCR inneholder denne aktiviteten (Hamilton *et al.*, 2001).

1.4 Målet med oppgaven

Målet med denne oppgaven var *in vitro* mutagenese av DNA polymerase I fra *Thermotoga maritima*. Genet for denne polymerasen var allerede klonet og satt inn i en eksprejonsvektor. Dette arbeidet ble gjort av Stephan Duss. Mutasjonen som skulle innføres var den såkalte Tabor-Richardson mutasjonen. Det vil si at fenylalanin på posisjon 730, som tilsvarer 762 hos *Escherichia coli*, skulle substitueres med en tyrosin. På denne måten blir det innført en OH-gruppe, noe som antakeligvis vil føre til mindre diskriminering mot dideoksynukleotider (Tabor *et al.*, 1995). Fordelen med en slik mutasjon hos *Tma* polymerase er at den da kan brukes i stedet for *Taq*-polymerase, som mangler 3'-5'eksonukleaseaktivitet. Ved bruk av enzymet i PCR er det en klar fordel at enzymet har denne aktiviteten.

Etter mutagenese av polymerasegenet, skal genet uttrykkes i *E.coli*, og proteinlysats skal fremstilles. Både nativ og mutert *Tma* polymerase vil bli uttrykt.

Dette lysatet bør så renses før videre karakterisering finner sted.

Det siste trinnet i oppgaven blir deretter å teste disse to polymerasene i sekvensering, for å se om *Tma* F730Y polymerase er blitt et bedre sekvenseringsenzym. Det vil også være interessant å sammenligne den muterte varianten av *Tma* polymerase med polymeraser i kommersielle kit, for eksempel *ThermoSequenase*, som er *Taq* polymerase I hvor Tabor-Richardson-mutasjonen er innført og 5'-3'eksonukleasen er fjernet (Vander Horn *et al.*, 1997).

2.0 Metoder

Denne delen tar for seg de metodene og teknikkene som ble benyttet i den praktiske utførelsen av denne hovedoppgaven. Hvis ikke annet er oppgitt er metodene hentet fra "Molecular cloning A laboratory manual", 2.utgave (Sambrook *et al.*, 1989).

Reagenser, utstyr og løsninger som har blitt benyttet er beskrevet under materialer, kapittel 5.

2.1 Arbeid med mikroorganismer

Når man arbeider med mikroorganismer som bakterier og fagpartikler er det viktig at arbeidet utføres sterilt. Kontaminering av prøver med fremmede bakterier, enzymer eller DNA kan føre til vanskeligheter i videre arbeid og bør unngås.

2.1.1 Sterilteknikk

I arbeid med mikroorganismer ble det benyttet grunnleggende sterilteknikk. Det vil si at de aller fleste løsningene som ble benyttet var autoklavert ved 120°C i 20 minutter eller sterilfiltrert gjennom et 0.45µm membranfilter. Pipettespisser, eppendorfrør og erlenmeyerkolber som ble benyttet ble også autoklavert. Glasstaver og podenåler ble sterilisert i 96 % etanol og brent av på gassbrenner. Arbeidet ble utført på arbeidsbenk i nærheten av gassbrenner og det ble hele tiden benyttet latekshansker.

2.1.2 Dyrking av *Escherichia coli*-bakterier

Ved dyrking av *E.coli*-bakterier er det viktig å vite hva slags stamme man har slik at dyrkingen foregår i rett vekstmedium. Det er også viktig å vite hva slags tilsetninger som er nødvendig for å sikre vekst av eventuelle plasmider, for eksempel antibiotika.

Kulturer med *E.coli*-bakterier dyrkes vanligvis over natt, ca. 16 timer, ved 37°C. Hvis man dyrker opp i flytende medium og ikke på vekstskåler, er det også viktig at kulturen dyrkes opp i beholdere som er ca. ti ganger større enn volumet til kulturen, og at kulturen dyrkes opp ved kraftig rysting. Dette er for å sikre bakterienes tilgang på oksygen slik at de ikke dør.

2.1.2.1 Tillaging av vekstskåler

Vekstskåler brukes til å dyrke opp bakterier som for eksempel er transformert med et plasmid. Når man dyrker opp på skåler vokser bakteriene opp i atskilte kolonier. Man er da sikker på at en koloni kun inneholder en type bakterie. Seleksjon på vekstskåler skjer ved å tilsette ulike typer næringsmidler eller antibiotika.

Prosedyre:

1. Tilsett agar til ønsket vekstmedium og autoklaver. Sjekk at all agar er smeltet etter autoklavingen.
2. La vekstmediet avkjøle seg til under 50°C. Tilsett deretter ønsket antibiotika og bland godt. Det er viktig at vekstmediet ikke har en temperatur på over 50°C, da dette kan ødelegge en del antibiotika.

3. Overfør vekstmediet til plastskåler på en steril laboratoriebank eller avtrekk. Hell ca. 25 ml i hver skål. Pass på å unngå bobler i skålene.
4. La skålene tørke et par timer. Snu skålene opp ned og legg dem i en forseglet plastpose. Skålene kan da lagres ved 4°C i 2-3 uker. Det kan være lurt å inkubere et par av skålene over natt ved 37°C for å kontrollere at de ikke er forurenset.

2.1.2.2 Oppdyrking av bakterier på vekstskåler

Prosedyre:

1. Ønsket mengde med bakterieløsning (50 ng<) tilsettes på skålen.
2. En bøyd glasstav dyppes i etanol og brennes av over gassbrenneren og brukes til å stryke bakterieløsningen utover skålen.
3. Lokket settes på og skålene inkuberes over natt ved 37°C. Det er da viktig at skålene står opp ned for å hindre at kondens drypper ned på vekstmediet.

2.1.2.3 Oppbevaring av bakterieceller som frysekultur

Hvis bakterieceller skal oppbevares over lang tid, bør de fryses ned ved -70°C i 15 % glyserol.

Prosedyre:

1. Dyrk en 5 ml kultur av bakteriene du ønsker å fryse ned over natt.
2. Overfør 850 µl av kulturen til et sterilt eppendorfrør. Tilsett 150 µl steril 100 % glyserol og bland godt.
3. Frys røret raskt ned i ett etanol/tørris-bad og plasser røret raskt over i fryser som holder -70°C.

2.1.2.4 Oppdyrking av *E.coli*-bakterier fra frysekultur

Bakterier fra frysekultur kan ofte vokse dårlig hvis de strykes rett ut på vekstskåler. Det lønner seg derfor å dyrke opp en liten bakteriekultur som så fortynnes og deretter strykes ut på skåler.

Prosedyre:

1. Rør med frysekultur tas ut av -70°C -fryseren og tines forsiktig på is. Overfør deretter litt av frysekulturen til 5 ml LB-medium med ønsket antibiotika. Settes til dyrking ved 37°C i en rysteinkubator.

2. Bakteriekulturen fortynnes 10^{-4} , 10^{-6} og 10^{-8} ganger, og 100 μl av fortynningene plates ut på hver sin vekstskål, og inkuberes over natt ved 37°C .
3. Plukk en koloni og overfør den til vekstmedium. Dyrk så kulturen ved 37°C i rysteinkubator til ønsket celletetthet (ca. 16 timer).

2.1.3 Dyrking av bakteriofag M13

Bakteriofag M13 inneholder et enkeltrådet DNA-molekyl som i denne oppgaven ble brukt til templat i en fluorescensbasert polymeraseaktivitetsanalyse. For å kunne dyrke bakteriofag M13 må vertsbakterien inneholde en F + -faktor (sex-pilus). Det er infeksjonsprosessen som er avhengig av pilustråder. Det spesielle med bakteriofag M13 er at vertscellene ikke lyseres når det blir frigitt nysyntetiserte fagpartikler gjennom celleveggen.

Det er to måter å dyrke opp M13 fagpartikler på. Enten ved å transformere kompetente *E.coli* celler med den dobbeltrådet replikative formen (RF) av M13, eller å infisere celler med intakte M13 fagpartikler.

Når bakteriekulturen er infisert skal den dyrkes opp til så høy celletetthet som mulig uten at den går inn i stasjonær fase der bakterielt DNA og RNA fra døde celler kan komme ut i kulturen.

Prosedyre:

1. Dyrk opp frysekulturbakterieceller med F + -faktor (i dette tilfelle *E.coli* JM103 celler) i 5 ml 2x YT-medium ved 37°C og med risting. Denne dyrkingen tar ca. 7 timer.
2. Transformer 0.2 μg M13-mp18 DNA inn i 100 μl superkompetente *E.coli* DH5 α -celler, og overfør det til 1 ml 2x YT-medium. La det stå og riste i ca. 3 timer ved 37°C .
3. Bland 5 ml med *E.coli* JM103 celler med 1 ml *E.coli* DH5 α -celler, og overfør det hele til en erlenmeyerkolbe med 400 ml 2x YT-medium. La det stå og riste kraftig ved 37°C i 10-12 timer. Unngå å få bakteriekulturen i stasjonær fase.

Videre isolering og rensing av enkeltrådet M13 blir beskrevet i metoder kap. 2.2.2

2.1.4 Håndtering av avfall fra bakteriekulturer

Bakterier i bakteriekulturer og vekstskåler inneholder ofte gener for antibiotika-resistens. Derfor er det viktig at slike kulturer og skåler destrueres før de kastes, slik at ikke disse genene kan bli overført til den naturlige bakteriefloraen. For å destruere bakteriene tilsetter man overskudd av natriumhydroksid til bakteriekulturen og lar den stå i ca. 1 time før man heller den ut. Små mengder med avfall kan kastes i spesial-avfallsbeholdere som senere blir sendt til forbrenning.

2.2 Arbeid med DNA

2.2.1 Plasmidisolering

Det finnes flere ulike måter å isolere plasmid på, og det finnes en rekke kommersielle kit tilgjengelig.

I denne oppgaven ble det benyttet GFX™ Micro Plasmid Prep Kit fra Amersham Biosciences.

Dette kitet baserer seg på prinsippet om alkalisk lysis. Bakteriece llene høstes da først ved sentrifugering og cellepelletten løses i en resuspensjonsbuffer som blant annet inneholder RNaseA. Deretter tilsettes en lysisbuffer. Denne inneholder detergenter som SDS og denaturerende agens som NaOH. Detergenten ødelegger cellemembranen slik at celleinnholdet frigjøres. Den basiske løsningen fører til at DNA denatureres. RNase i løsningen vil bryte ned RNA. Neste trinn er å tilsette en nøytraliseringsbuffer som blant annet inneholder kaliumacetat. Dette vil nøytralisere løsningen og føre til at plasmid-DNA vil renaturere, mens proteiner og lange kromosomale DNA-tråder vil felles ut sammen med SDS. Etter påfølgende sentrifugering vil de små, sirkulære plasmidene finnes i supernatanten, mens kromosomalt DNA vil befinne seg i bunnfallet. Supernatanten kan da benyttes videre.

2.2.1.1 Kvikk-sjekk metoden:

En rask metode for å se om en bakteriekultur inneholder plasmid, og eventuelt størrelsen på plasmidet er å utføre en kvikk-sjekk. Denne metoden går ut på å felle ut proteinene i cellene ved hjelp av fenol:kloroform, og sette DNA som finnes i vannfasen på en agarosegel.

Metoden er veldig gunstig hvis man skal sjekke mange bakteriekulturer for plasmid samtidig. Man slipper da å rense plasmid før man vet at kulturen virkelig inneholder plasmid. Bakteriece llene ødelegges ved behandling med fenol og kloroform slik at proteiner felles ut mens nukleinsyrer blir værende i vannfasen.

Prosedyre:

1. -For kolonier: kolonier plukkes med en tannpirker og resuspenderes i 30 µl av en 10:1 blanding av TE-buffer og loading buffer.
-For overnatte skulturer: 27 µl av overnatte skulturen blandes med 3 µl loadingbuffer.
2. Tilsett 25 µl fenol-kloroform og vortex i 30 sekunder. Sentrifuger i 3 minutter og sett 15 µl av den øvre vannfasen på en 0.8% agarosegel.
3. Agarosegelen kjøres på 100 V i ca. 1 time. Deretter tas det ett bilde av gelen i UV-lys. Metoden er nærmere beskrevet i punkt 2.2.3.

-De sterkeste båndene på gelen er ribosomalt RNA. Plasmider vil danne svakere bånd over disse. Disse kan deretter sammenlignes med molekylvektsstandarder og eventuelle referanseplasmider på gelen.

2.2.1.2 Plasmidrensing med GFX™ Micro Plasmid Prep Kit:

Kittet er basert på alkalisk lysering av bakteriene, etterfulgt av DNA-binding til en glassfibrermatriks. Deretter kan urenheter vaskes bort før DNA elueres ved hjelp av en buffer med lav ionestyrke, for eksempel TE-buffer.

Rensing av 2-3ml overnattskultur.

Cellelysis:

1. Overfør 1-1.5 ml overnattskultur til et 1.5 ml eppendorfrør. Sentrifuger ved full hastighet i 30 sekunder for å pelletere cellene.
2. Fjern så mye av supernatanten som mulig uten å ødelegge pelletten.
3. Overfør på ny 1-1.5 ml overnattskultur til eppendorfrøret, og sentrifuger igjen ved full hastighet i 30 sekunder.
4. Fjern supernatanten, og resuspender pelletten fullstendig i 300 µl av løsning I ved hjelp av kraftig vortexing. Løsning I er en isoton løsning som inneholder RNase som bryter ned RNA i løsningen.
5. Tilsett 300 µl av løsning II og bland ved å invertere røret 10-15 ganger. Løsningen må ikke stå mer enn 5 minutter etter tilsetning av løsning II. Bakterieløsningen bør begynne å se klarere ut ettersom cellene lyses. Løsning II inneholder NaOH og SDS slik at alt DNA denatureres.
6. Tilsett 600 µl av løsning III og bland ved å invertere røret til et hvitt bunnfall kommer til syne. Bland til bunnfallet er jevnt fordelt i røret. Løsning III er en nøytraliseringsbuffer som nøytraliserer pH-verdien til lysatet. Dette fører til renaturering av plasmid-DNA. Løsningen inneholder også salter som fremmer binding av DNA til glassfibrermatriksen.
7. Sentrifuger ved full hastighet i 5 minutter for å pelettere celledetritus.
8. Klargjør en GFX-kolonne til hvert prep, ved å plassere kolonnen i et oppsamlingsrør.

DNA-rensing:

1. Overfør hele supernatanten til et nytt eppendorfrør.
2. Overfør ca. halvparten av supernatanten til GFX-kolonnen. Inkuber i 1 minutt ved romtemperatur.
3. Sentrifuger ved full hastighet i 30 sekunder, og tøm så ut innholdet i oppsamlingsrøret.
4. Overfør resten av supernatanten til kolonnen. Inkuber i 1 minutt ved romtemperatur.

5. Sentrifuger ved full hastighet i 30 sekunder, og tøm så ut innholdet i oppsamlingsrøret.
6. Tilsett 400 µl vaskebuffer til kolonnen. Sentrifuger ved full hastighet i 1 minutt for å fjerne buffer og tørke ut matriksen før eluering.
7. Tilsett 100 µl TE-buffer til kolonnen. Inkuber i 1 minutt ved romtemperatur og sentrifuger så ved full hastighet i 1 minutt for å eluere DNA. Hvis en mer konsentrert DNA-prøve ($>0.5\mu\text{g}/\mu\text{l}$) er ønskelig, kan man eluere med 50 µl TE-buffer.

2.2.2 Isolering av enkeltrådet DNA fra bakteriofag M13

M13 fagpartiklene er sirkulære ssDNA. De ødelegger ikke vertscellen slik at man kan få produsert og frigitt M13 fagpartikler i vekstmediet ved å dyrke opp M13-infisert bakteriekultur til nesten stasjonær fase. Fagpartiklene som er igjen i supernatanten etter at bakteriecellene er spunnet ned kan felles ut med PEG, og ved fenolekstraksjon blir proteinkappen fjernet og enkeltrådet M13 isolert.

Prosedyre: (Kristensen, T., *et al.* 1987)

1. Infiser *E.coli* celler (med f⁺ -faktor) med M13 fagpartikler, eller transformer de med den replikative formen av M13-DNA. Dyrk som beskrevet i metoder kap.2.1.3.
2. Sentrifugeres 400 ml av den infiserte bakteriekultur som er dyrket i ca. 10 timer, ved 5.000x g i 15 minutter ved 4°C. Bakteriepelleten kastes.
3. Tilsett 12 g NaCl og 16 g PEG (8000) til supernatanten for å felle ut fagpartiklene. Løsningen skal stå 1 time ved romtemperatur.
4. Sentrifuger blandingen ved 1000x g i 20 minutter ved 4°C. Hell av supernatanten og en hvit fagpartikkelpellet bør være synlig.
5. Løs opp pelleten i 16 ml 10mM Tris-HCl (pH 8.0), og overfør det hele til et nytt 30 ml sentrifugerør.
6. Tilsett 16 ml fenol til løsningen, og vortex kraftig i 2 minutter. Sentrifuger ved 3000 x g i 5 minutter ved romtemperatur.
7. Den øvre klare vannfasen overføres til et nytt rør, tilsettes 16 ml fenol:kloroform (1:1) og vortexes i 2 minutter. Sentrifuger så ved 3000 x g i 5 minutter ved romtemperatur. Gjenta proteinekstraksjonen 3 ganger, eller til det ikke er mer presipitat igjen mellom de to fasene i røret.
8. Tilsett 1.6 ml 3 M NaOAc og 35.2 ml etanol (96 %) til den øvre vannfasen for å felle ut DNAet. Sett løsningen på is i 1 time.

9. Sentrifuger det hele ved 12.000x g i 20 minutter ved 4°C. Fjern supernatanten og vask DNA-pelleten ved å tilsette 48 ml 70 % etanol ved 4°C og vortex forsiktig.
10. Sentrifuger ved 12.000x g i 20 minutter ved 4°C, og fjern supernatanten godt ved å sette røret opp ned på benken til all etanol er borte.
11. Løs pelleten i ønsket mengde TE-buffer, og oppbevar det hele ved -20°C.

2.2.3 Agarosegel-elektroforese av DNA

Agarose er et polysakkarid som danner en fast gel når det er løst i vann ved konsentrasjoner 0.5-2 %. Ved å variere konsentrasjonen av agarose får man geler med ulike porestørrelser, og dermed ulike separasjonsområder. DNA-prøven appliseres på gelen i brønner, og gelen blir plassert i et elektrisk felt. Siden DNA er negativt ladet vil DNA-fragmentene i en gel vandre mot den positive polen i et elektrisk felt med en hastighet som er avhengig av størrelse og form. I en agarosegel vil alltid små DNA-fragmenter vandre fortere enn større fragmenter. Dette er fordi de større fragmentene blir mer hindret i sin passasje gjennom porene enn mindre fragmenter. Agarosegel-elektroforese kan derfor benyttes til å skille DNA-fragmenter med ulik størrelse fra hverandre. En agarosegel med 2 % agarose vil gi god separasjon av små DNA-fragmenter (>0.5 kb), mens en agarosegel med 0.8% agarose gir god separasjon i området 0.5-10 kb, og er den mest benyttede konsentrasjonen. For å kunne synliggjøre DNA på gelen tilsettes Etidiumbromid (EtBr) til gelen før den stivner. EtBr er et stoff som interkalierer mellom baseparene i DNA. EtBr vil være synlig i UV-lys slik at man kan se og ta bilde av de ulike båndene med DNA i gelen.

Prosedyre:

1. Lag en agaroseløsning med ønsket konsentrasjon.
2. Agaroseløsningen tilsettes EtBr til 0.5 µg/ml. Løsningen blandes godt og helles opp i en gelform og en kam som danner brønner settes på plass. La gelen stå til den er stivnet, ca. en halv time.
3. Gelen legges i elektroforesekaret og 1 X TAE-buffer helles over til gelen er dekket med buffer. Kammen tas ut av gelen.
4. DNA-prøvene tilsettes agarosegel loadingbuffer til konsentrasjonen er 1X og appliseres i brønnene ved hjelp av en pipette.
5. Elektroforesen kjøres ved ca. 100 V ved romtemperatur.
5. Etter endt elektroforese tar man bilde av gelen i UV-lys.

2.2.4 Kvantitering av DNA

2.2.4.1 Kvantitering av DNA ved hjelp av UV-spektrofotometri

Konsentrasjonen av DNA/RNA i en prøve kan bestemmes ved hjelp av spektrofotometri. Prøven måles da ved 260 nm. En OD-verdi på 1 tilsvarer en konsentrasjon på ca. 50 µg/ml for dobbelttrådig DNA, 40 µg/ml for enkelttrådig DNA og RNA og 20 µg/ml for enkelttrådig oligonukleotider. Ratioen mellom OD₂₆₀/OD₂₈₀ sier noe om renheten til nukleinsyren. Rene preparater har en ratio på mellom 1.8 og 2.0.

2.2.4.2 Kvantitering av DNA ved hjelp av etidiumbromid-fluorescens

Fluorescensintensiteten på grunn av interkalert EtBr er proporsjonalt med DNA-mengden, og man kan derfor benytte seg av dette for å estimere mengden DNA i en prøve. Man kjører da de ukjente DNA-prøvene i en agarosegel med EtBr, sammen med en standard av kjent konsentrasjon. Denne metoden egner seg best til små DNA-mengder eller til prøver som er så urene at estimering ved hjelp av UV-spektrofotometer ikke er mulig.

Prosedyre:

- 1, 2, 3, 4 og 5 µl av den ukjente prøven tilsettes MQ-vann til totalt 10 µl.
- 1-2 µl standard-DNA, for eksempel λ-DNA kuttet med *EcoRI* og *HindIII*, tilsettes vann til totalt 10 µl.
- Alle prøvene tilsettes 2 µl 6 X loadingbuffer og kjøres på en agarosegel som beskrevet ovenfor, og man tar et bilde av gelen i UV-lys.
- Deretter sammenlignes intensiteten på DNA-båndene i de ukjente prøvene med intensiteten i båndene som inneholder standardprøvene. DNA-bånd med samme intensitet antas å inneholde samme mengde DNA og man kan da regne ut konsentrasjonen i de ukjente prøvene.

Hvis man benytter λ-DNA kuttet med *EcoRI* og *HindIII*, bestemmes mengden av DNA i de ulike båndene som DNA-fragmentets prosentvise del av total DNA (se tabell 2.1).

Bånd	Fragmentstørrelse, kb	% av total størrelse
1	21.22	43.8
2	5.14, 4.97	20.8
3	4.26	8.8
4	2.02	4.2
5	1.90	3.9
6	1.58	3.3
7	1.37	2.8

Tabell 2.1 Viser størrelsen av DNA-fragmentene fra λ-DNA kuttet med restriksjonsenzymene *EcoRI* og *HindIII*. Total størrelse av λ-DNA er 48500kb. Markøren er levert fra Fermentas.

DNA i den ukjente prøven regnes da ut etter formelen:

$$\mu\text{g } \lambda\text{-DNA (på gel)} \times \% \text{ av total størrelse} = \mu\text{g ukjent DNA (på gel)}$$

2.2.5 Polymerase kjedereaksjon (PCR)

PCR er en metode som benyttes for å amplifisere et spesifikt DNA-fragment *in vitro* i en thermosyklus-maskin. Man bruker da to oligonukletidprimere som hver er komplementære til de flankerende sekvensene til DNA-sekvensen som skal amplifiseres. Disse primerne forlenges mot hverandre av en varmestabil polymerase i en reaksjonssyklus som består av tre trinn; denaturering, primer-annealing og elongering. Først blir reaksjonen varmet opp til ca. 95°C i 3-4 minutter. Dette kalles hot-start og sørger for at alt DNA blir denaturert til enkelttråder. Deretter følger et visst antall sykluser. Både antall sykluser og lengden på hvert trinn tilpasses den individuelle reaksjonen. Det første trinnet i hver syklus er denaturering av DNA til enkelttråder. Reaksjonen blir da varmet opp til ca. 95°C i ca. 30 sekunder. Deretter følger annealingstrinnet. I dette trinnet skal oligonukleotidprimerne feste seg til sin komplementære DNA-sekvens. Temperaturen senkes i dette trinnet til ca. 55°C i omtrent 30 sekunder. Annealingtemperaturen avhenger av nukleotid-komposisjonen, og varierer fra primer til primer. Så økes temperaturen igjen til ca. 72°C i elongeringstrinnet hvor DNA polymerasen forlenger primerne. Lengden på dette trinnet avhenger først og fremst av størrelsen på DNA-fragmentet som skal amplifiseres. For at dette trinnet skal bli vellykket må det selvfølgelig være frie dNTP'er og Mg^{2+} -ioner i løsningen. Etter elongeringstrinnet blir løsningen igjen varmet opp til 95°C for et nytt denatureringstrinn. I den andre syklusen vil primerne binde seg til de nysyntetiserte ssDNA-trådene, og kopiere enden av de første primerne slik at etter syklus 2 vil reaksjonen inneholde syntetiserte DNA-molekyler med korrekt og ønsket lengde. Antallet med korrekte DNA-molekyler vil deretter doble seg for hver syklus. Hvis en PCR var 100 % effektiv ville DNA-sekvensen bli kopiert til 2^n etter n sykluser.

En av fordelene med PCR er at man ikke trenger mye eller spesielt rent DNA som utgangspunkt. Det eneste man trenger er noe sekvensinformasjon slik at man kan lage primere som er tilnærmet komplementære.

Når det gjelder de to oligonukleotidprimerne er disse vanligvis 18-30 nukleotider lange og er designet slik at de festes på hver sin side av målsekvensen, slik at de forlenges mot hverandre ved addisjon av nukleotider til 3'enden. Primerne bør ha omtrent samme smeltepunkt slik at de annealer til DNA ved lik temperatur.

Prosedyre:

1. Bland i et 0.5 ml sterilt PCR-rør:

DNA-templat	
Varmestabil DNA polymerase	(ca. 2 units)
DNA polymerasebuffer	(varierer med polymerasen som benyttes)
dNTP-miks	(200 μ M av hver)
N-terminal primer	(ca. 1 μ M)
C-terminal primer	(ca. 1 μ M)
MilliQ-vann	

Man bør også kjøre to kontroller; en uten templat og en uten primer. Volumet erstattes da med MilliQ-vann. Bland godt, spinn raskt ned og oppbevar reaksjonsblandingen på is.

2. Sett PCR-rørene i PCR-maskinen og start et PCR-program som er tilpasset reaksjonen.
3. 5 μ l av den ferdige PCR-reaksjonen undersøkes på en agarosegel for å verifisere produkt dannelse.

I denne oppgaven ble PCR benyttet i forbindelse med mutagenese av Tma-polymerase I, som blir beskrevet under punkt 2.2.8, og i forbindelse med DNA-sekvensering, beskrevet under punkt 2.3.

2.2.6 Kutting med restriksjonsenzymmer

Restriksjonsenzymmer er bakterielle enzymer. I bakterien er disse enzymene en del av bakteriens forsvarsmekanismer ved at de kutter opp fremmed DNA. Bakterien skiller mellom eget og fremmed DNA ved at bakteriens eget DNA er metylert i spesifikke seter i sekvensen. Fremmed DNA som mangler metylgruppen i disse setene blir dermed angrepet av restriksjonsenzymene. Det finnes mange ulike restriksjonsenzymmer fra ulike bakterier. Hvert restriksjonsenzym gjenkjenner en spesiell DNA-sekvens på 4-8 basepar, og kutter ett spesifikt sted i denne sekvensen. Enzymene har også ulike måter å kutte på. Noen kutter slik at det blir et 3'overheng eller 5'overheng og andre kutter slik at det blir en butt ende. På 3'overheng sitter alltid hydroksylgruppen igjen og på 5'overheng sitter alltid fosfatgruppen igjen. Disse overhengene kalles for klebrige eller kohesive ender, fordi de kan binde seg til hvilken som helst DNA-ende som har den komplementære nukleotid-sekvensen. Dette gjør at et fragment etter kutting med et restriksjonsenzym, kan kobles sammen med et annet fragment som er kuttet med det samme restriksjonsenzymet ved hjelp av DNA-ligase. Dette er blant annet prinsippet bak ligering av fragmenter inn i ulike vektorer, noe som er en av de viktigste bruksområdene for restriksjonsenzymmer. Restriksjonsenzymmer kan også brukes til å påvise en mutasjon dersom mutasjonen enten har dannet et nytt restriksjonssete eller fjernet et eksisterende restriksjonssete. Denne metoden ble benyttet i forbindelse med mutagenesen som beskrevet under punkt 2.2.8.

Prosedyre:

Ulike restriksjonsenzymmer fungerer best under ulike betingelser. Det som er felles for alle er at de krever Mg^{2+} -ioner (10 mM), men de har forskjellig pH-, salt- og temperaturoptimum.

1. Bland ønsket mengde med DNA som skal kuttes, restriksjonsenzym (2-3 units), reaksjonsbuffer og MilliQ-vann til ønsket volum i et eppendorfrør. Sett løsningen på is.
2. Inkuber reaksjonsblandingen i ca. 2 timer ved optimal temperatur for enzymet.
3. Inaktiver enzymet dersom dette anbefales av leverandør, for eksempel ved oppvarming til 75°C i 10 minutter.
4. Analyser deler av restriksjonsblandingen på en agarosegel sammen med en størrelsesmarkør. Det kan også være lurt å ta med en prøve med ukuttet plasmid.

2.2.7 Transformering av kompetente celler:

For å oppnå større mengder med plasmid eller for å uttrykke proteinet genet koder for, må man transformere plasmidet inn i en vertscelle som enten kan replikere plasmidet og eventuelt transkribere og translatere genet som sitter i plasmidet. For å oppnå sistnevnte må man ha en såkalt ekspresjonsvektor. Dette er en vektor som inneholder induserbare promotere og andre kontrollsekvenser som er nødvendige for ekspresjon. Det finnes flere metoder for transformering av celler. Man kan blant annet benytte sonikering, elektroporering eller kalsiumkompetente celler. Selv om metodene er ulike har de samme hensikt, nemlig å svekke celleveggen hos verten slik at plasmidet blir tatt opp med større effektivitet i cellene. I denne oppgaven ble det benyttet kalsiumkompetente celler. Disse cellene har blitt dyrket i SOB-medium, vaskes i PIPES-buffer og behandles til slutt med DMSO. Etter behandlingen fryses cellene ned i alikvoter ved -70°C, og kan da lagres i flere måneder. I oppgaven ble det benyttet ferdiglagede kompetente DH5α *E.coli*-celler.

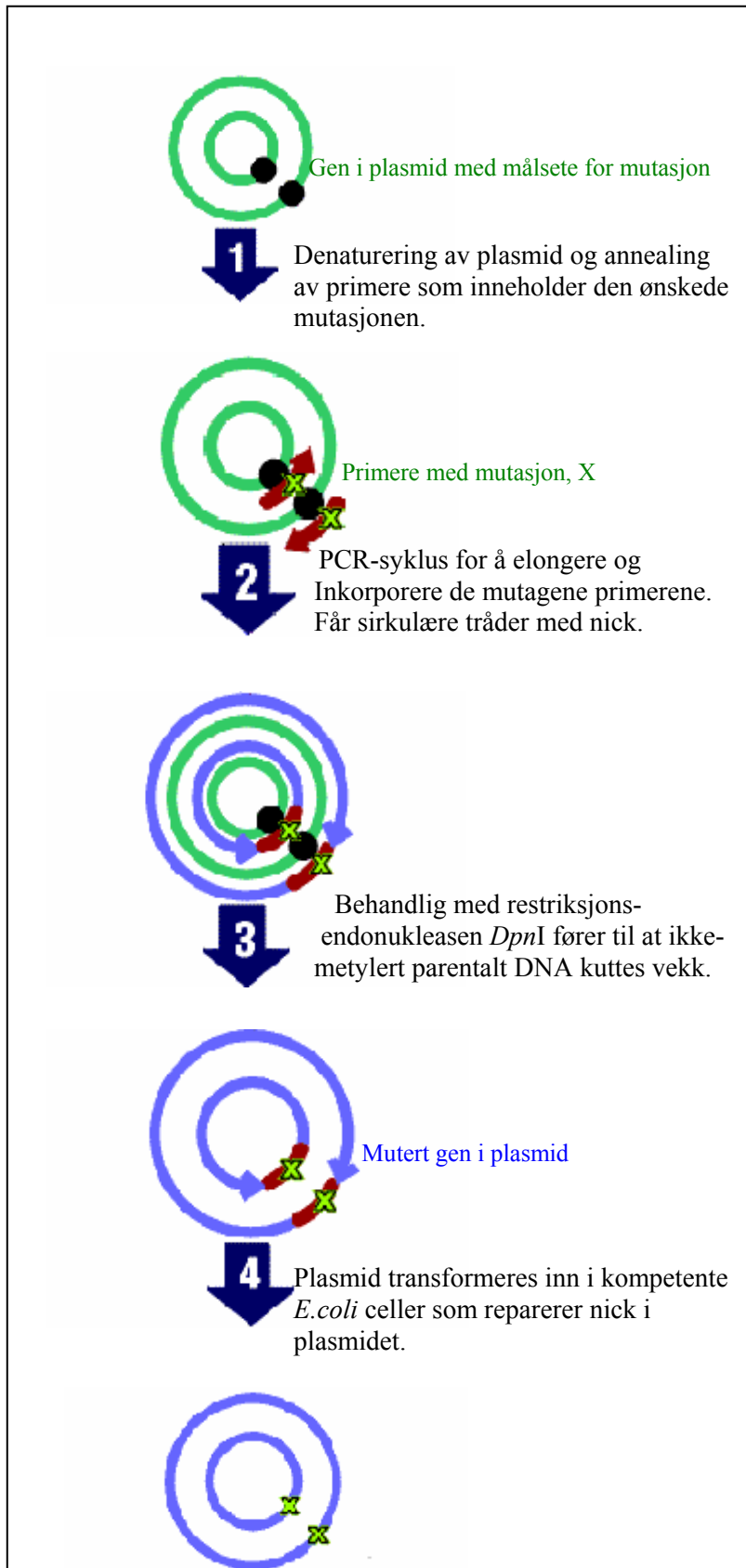
Prosedyre:

1. Tin de kompetente cellene forsiktig på is
2. 10-50 ng plasmid-DNA tilsettes 150-200 µl kompetente celler.
3. La blandingen stå på is i 30 minutter.
4. Inkuber blandingen ved 42°C i 45 sekunder.
5. Sett blandingen på is i 2-3 minutter
6. Plat ut bakteriene på en vekstskål med ønsket seleksjonsmedium, og inkuber skålene ved 37°C over natt. Deretter kan kolonier plukkes og dyrkes videre i LB-medium.

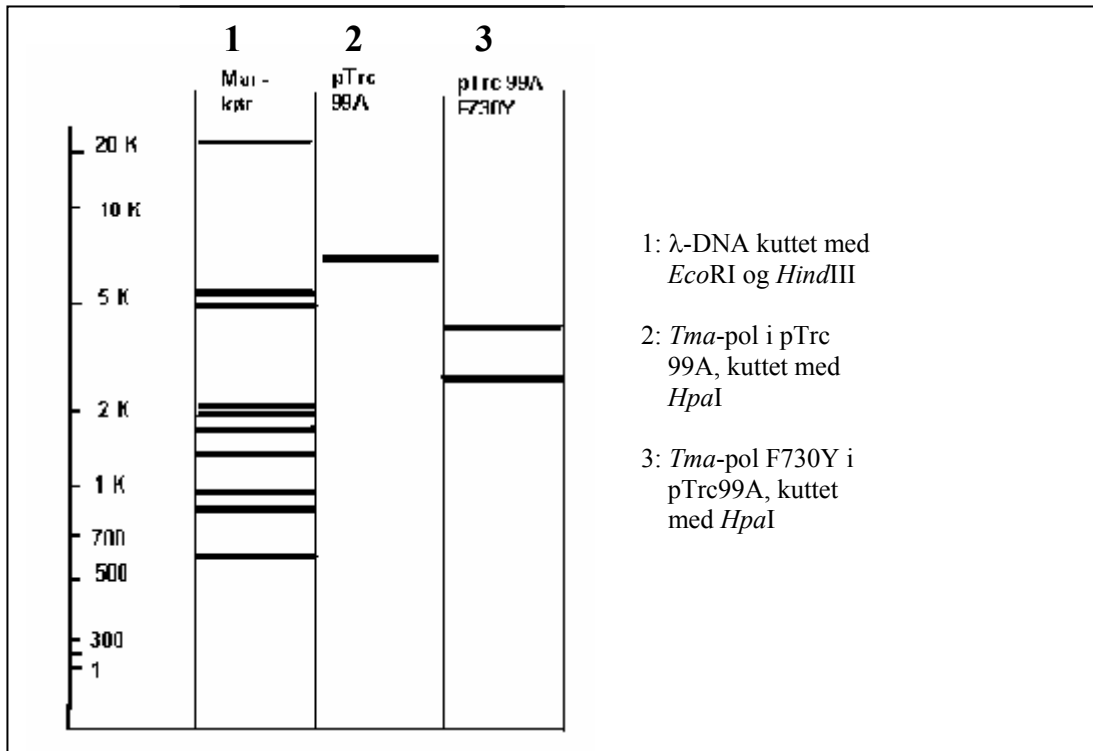
2.2.8 Mutagenese av DNA

I denne oppgaven skulle den såkalte Tabor-Richardsonmutasjonen innføres i genet som koder for DNA polymerase I fra *Thermotoga Maritima*. Til dette ble QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit fra Stratagene benyttet. Dette er et kit som kan benyttes til å innføre punktmutasjoner, bytte ut aminosyrer og til å sette inn eller fjerne en eller flere aminosyrer. I dette tilfellet ble det utført to punktmutasjoner som førte til en aminosyresubstitusjon. Metoden utføres ved å benytte *PfuTurbo* DNA polymerase og en PCR-maskin. Metoden tar utgangspunkt i at genet av interesse er ligert inn i en dobbeltrådig vektor. Videre trenger man to syntetiske oligonukletidprimere som inneholder den ønskede mutasjonen. De to primerne er komplementære til hver sin tråd i det dobbeltrådige genet. Primerne forlenges i PCR-maskinen ved hjelp av *PfuTurbo* DNA polymerasen, slik at man får muterte plasmider med enkelttrådig nick i hver tråd. Deretter blir PCR-produktet kuttet med *DpnI* endonuklease. Endonukleasen er spesifikk for metylert og hemi-metylert DNA og brukes for å kutte vekk det parentale DNA-templatet, slik at man kun sitter igjen med muterte plasmider, da disse ikke er metylert. DNA-vektorene med mutasjon blir så transformert inn i XL1-Blue superkompetente celler. Mutagenesen er illustrert i figur 2.1 nedenfor, som er hentet fra instruksjonsheftet fra Stratagene. Cellen dyrkes opp i kultur og man renser ut plasmid for å sjekke om mutasjonen er innført. Dette gjøres ved å sjekke om plasmidene kuttes av restriksjonsenzymet *HpaI*. Når man innfører mutasjonen $F \Rightarrow Y$ endrer man et kodon fra TTT til TAT. Dette innfører et nytt palindromt sete TAATTA. Det finnes ingen enzymer som kutter i denne sekvensen, men en T i N-kodonet kan endres til C uten å endre sekvensen. Det nye kodonet er et hyppigere brukt N-kodon i *E.coli* enn AAT. Dette innfører GTTAAC som kuttes av *HpaI*. Det finnes allerede ett kuttsete for *HpaI* i plasmidet. Man vil derfor se to bånd etter kutting med *HpaI* hvis mutagenesen har vært vellykket, men bare ett bånd hvis mutasjonen ikke er innført. Se figur 2.2

Primer: CCGTATATGATGGAAATAGTTAAC CATT^{TT}TACCAG



Figur 2.1: Illustrasjon av mutagenese med QuikChange™ site-directed mutagenesis kit.



Figur 2.2: Figur av hvordan umutert og mutert *Tma-pol* vil se ut på en agarosegel etter kutting med *HpaI*.

Prosedyre: Fremgangsmåten i instruksjonsheftet fra Stratagene ble fulgt.

1. I oppgaven ble det benyttet gen som var ligert inn i pTrc99A-plasmidet. Fire ulike konsentrasjoner ble benyttet med henholdsvis 5, 10, 20 og 50 ng plasmid-DNA. I tillegg ble det tilsatt 125 ng av hver primer, 5 µl 10x reaksjonsbuffer og 1 µl dNTP-miks. Deretter ble alle reaksjonene tilsatt ddH₂O til totalvolum på 50 µl.
2. Så ble 1 µl *PfuTurbo* DNA polymerase tilsatt (2.5U/µl).
3. Deretter ble reaksjonen kjørt PCR-maskinen med følgende sykluser:

Segment	Syklus	Temperatur, °C	Tid
1	1	95	30 sek
2	12	95	30 sek
		55	1 min
		68	14 min

Tabell 2.2: Oversikt over de ulike trinnene som ble gjennomført i mutagenesen.

12 sykluser ble anbefalt for innføring av punktmutasjoner.
For elongeringstrinnet ble det anbefalt 2min/kb plasmid.

4. Etter endt PCR settes reaksjonene på is i 2 minutter for å avkjøles til 37°C.
5. Tilsett 1 µl av *DpnI*. Løsningen blandes forsiktig, sentrifugeres i 1 minutt og inkuberes ved 37°C i 1 time. Deretter settes reaksjonene på is.

6. 1 µl av reaksjonsmiksen transformeres inn i 50 µl XL1-Blue superkompetente celler, plates ut på Agar-skåler med Ampicillin og inkuberes ved 37°C i 16 timer.
7. Kolonier fra skålene dyrkes opp i 5 ml LB-medium med Ampicillin over natt ved 37°C.
8. Plasmid ble renset ut ved hjelp av GFX-kit, og innføring av mutasjonen ble så kontrollert ved kutting med *HpaI* ved 37°C i 1 time.

2.3 Analyse av DNA-sekvens

2.3.1 DNA-sekvensering ved kjedetermineringsmetoden

DNA-sekvensering er en teknikk der man får bestemt baserekkefølgen i et DNA-molekyl. Det finnes flere metoder for sekvensering av DNA, men i denne oppgaven ble Sangers kjedetermineringsmetode (Sanger, F., *et al.* 1977) benyttet. DNA polymerase syntetiserer DNA ut i fra et spesifikt primet sete på DNA-templatet i nærvær av dNTP og ddNTP. Når DNA polymerasen setter inn en ddNTP i den voksende DNA-kjeden, vil den videre forlengelsen stoppe. Forholdet mellom dNTP og ddNTP i reaksjonen blir justert slik at DNA polymerasen vil sette inn ddNTP med lav frekvens (ca. 1 %) i forhold til dNTP.

2.3.2 Syklisk sekvensering i ALFexpress™

Varmestabile DNA polymeraser og PCR-teknologi har gjort nukleotidsekvensering til en meget følsom teknikk, der krav til mengden og kvaliteten av DNA-templatene ikke er så strenge (Murray, V., 1989). Ved bruk av varmostabile DNA polymeraser kan sekvenseringsreaksjonene kjøres i sykluser med denaturering, festing av primere og forlengning av primerne, som vil gi en lineær amplifisering av de terminerte DNA-fragmentene. Denne varianten av DNA-sekvensering kalles syklisk sekvensering, og metoden benytter seg av relativt små mengder med dobbeltrådet DNA-templat (0.1 – 1 µg).

I disse forsøkene ble det benyttet en Cy5- merket universalprimer. Både den muterte og den umuterte varianten av *Tma* DNA polymerase I ble benyttet, under forhold som var optimale for hver av dem. Det ble også benyttet *Taq* polymerase, med og uten F667Y-mutasjonen. DNA-templatet kan være enkeltrådet eller dobbeltrådet, og var i dette tilfellet enkelttrådig M13 og dobbeltrådig pGEM.

Prosedyre: (Analyse av en klon med 4 termineringsreaksjoner).

Buffere, 10x reaksjonsbuffer og termineringsløsninger er beskrevet i materialer kap. 5.3

1. Bland følgende løsninger i et sterilt 0.5 ml PCR-rør:

DNA-templat (ssM13, 1µg/µL)	1 µl
10x FS Reaksjonsbuffer:	2 µl
Cy5-merket primer (4pmol/µL)	1 µl
Enzymløsning, ønsket mengde	
MQ-vann til 21 µl	

2. Fordel blandingen i alikvoter på 5 µl i 0.5 ml PCR-rør merket A, C, G og T.
3. Tilsett termineringsløsningene til hvert sitt rør. Termineringsløsning A skal tilsettes rør A, termineringsløsning C skal tilsettes rør C, osv. Bland godt og spinn raskt ned. I dette forsøket ble det tilsatt 4 µl av termineringsløsningen til *Tma* polymerase og *Taq* polymerase, og 2 µl av termineringsløsningen til *Tma* polymerase FY og *Taq* polymerase FS.
4. Sett rørene i en PCR-maskin, som utfører følgende sykluser:

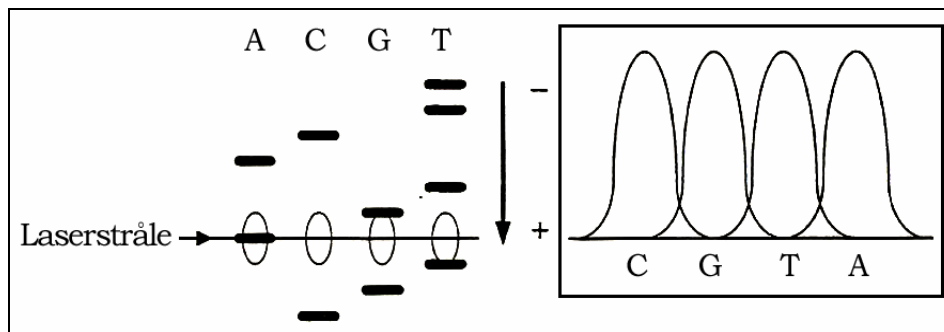
Trinn 1: 95°C i 2 min
 Trinn 2: 95°C i 30 sek
 Trinn 3: 50°C i 30 sek
 Trinn 4: 72°C i 40 sek
 Trinn 5: 29 sykluser av trinn 2-4
 Trinn 6: 72°C i 10 min
 Trinn 7: 4°C ∞
 Trinn 8: slutt.

Stopp reaksjonene ved å tilsette 4 µl stoppløsning, og oppbevar prøvene ved 4°C, eller ved -20°C for lagring over lengre tid. Analyser prøvene på en automatisk sekvenseringsmaskin som beskrevet nedenfor.

2.3.3 Automatisk sekvensering med ALFexpress™

Automatiske sekvenseringsmaskiner benytter en laser for å detektere DNA-fragmenter som er merket med en fluorescerende forbindelse. Ved manuell sekvensering brukes det radioaktivt merkede forbindelser som kan fremkalles ved autorradiografi. ALFexpress™ fra Pharmacia Biotech er konstruert for å separere og detektere fluorescerende DNA-fragmenter ved gelelektroforese. Ved et visst punkt i gelen treffer DNA-fragmentene en laserstråle, og laseren sender ut lys med en bølgelengde der fluoroforene i DNA'et eksiteres. Lyset som emitteres detekteres av fotodetektorer som er plassert bak gelen (fig. 2.3). Det er 40 fotodetektorer, og når fire spor benyttes for hver klon som skal sekvenseres, og en detektor er nødvendig for hvert spor, så kan ALFexpress™ dermed sekvensere 10 kloner samtidig.

ALFexpress™ inneholder et softwareprogram som omdanner detektorsignalene til sekvens. Data kan prosesseres automatisk, og DNA-sekvensen kan senere rettes manuelt dersom det er ønskelig. Dette gjøres i Sequence Analyser 2.10.



Figur 2.3: Prinsippet for DNA-sekvensering med ALFexpress™.

Fluorescensmerkede DNA-fragmenter i de ulike reaksjonene detekteres av fotoceller som er montert bak gelen når de belyses av laserstrålen. Signalene fra fotocellene registreres som funksjon av tiden, og DNA-sekvensen bestemmes ut i fra rekkefølgen på signalene (Amersham Biosciences).

2.3.3.1 Montering av gel-kassetten

Prosedyre: (ALFexpress™ DNA-Sequencer User Manual).

1. Vask glassplaten, varmeplaten, glass-spacere og kam godt med lunkent springvann (37°C). Bruk ikke for varmt vann da platene kan sprekke. Bruk oppvaskkost og papir. Tørk av platene og legg de på et stødig underlag med innsiden opp.
2. Vask så begge platene med MilliQ-vann, tørk av med papir, og vask så med 70 % etanol. Dette gjentas to ganger, eller til alle gelrester er fjernet fra glassplatene. For å få gelen til å feste seg godt ved området rundt brønnene smøres litt Bind-Silane på de øverste 2-3 cm på varmeplaten. Dette poleres og tørkes av med papir. Vask en siste gang med etanol og tørk godt av med papir.
3. Legg de rene spacerne på kanten til varmeplaten, og legg forsiktig glassplaten med innsiden inn oppå varmeplaten og spacerne. Pass på at spacerne ligger rett, og kant i kant med glassplatene. Fest klemmer på hver side for å holde glassplaten på plass (3 stk. på hver side).
4. Sett inn den rene kammen øverst mellom glassplatene, og sett en liten klemme på kammen slik at den sitter fast.

2.3.3.2 Tillaging av akrylamid gelløsning

Til nukleotidsekvensering ble det benyttet 6 % polyakrylamidgeler med 7 M urea i 1x TBE- buffer. Sekvenseringsgelen ble laget ut fra en 50 % oppbevaringsløsning med kommersiell Long Ranger[™] gelløsning fra BMA.

Prosedyre: (ALFexpress[™] DNA-Sequencer User Manual).

- Lag akrylamid gelløsning med følgende reagenser for 6 % gelløsning:

Long Ranger [™] (50 % oppbevaringsløsning).	7.2 ml
10x TBE-buffer	6.0 ml
Urea, ALF grade	25.2 g
MilliQ-vann	25.0 ml

2.3.3.3 Støping av akrylamidgel

For å starte polymeriseringen av akrylamidgelløsningen tilsettes 10 % ammoniumpersulfat (APS) og N, N, N', N'-tetrametyletyldiamin (TEMED).

Prosedyre: (ALFexpress[™] DNA-Sequencer User Manual).

1. Filtrer 60 ml akrylamidgelløsning gjennom et 45 µm vakuumfilter.
2. Overfør gelløsningen til et 250 ml begerglass, og tilsett 400 µl 10 % APS, og 40 µl TEMED og bland godt.
3. Sug opp gelløsningen i en 50 ml sprøyte og press innholdet inn mellom glassplatene nederst på gel-kassetten. Press forsiktig på sprøyten for å unngå luftbobler. Bank forsiktig på glassplaten hvis gelfronten henger igjen mellom platene. Fyll på gelløsning til det har dekket kammen.
4. La gelen polymerisere i ca. 1 time.
5. Kontroller at det ikke er gelmateriale eller andre forurensinger på yttersiden av glass-spacerne der laserlyset trenger inn i gelen.

2.3.3.4 Start og kjøring av ALFexpress[™]

Prosedyre: (ALFexpress[™] DNA-Sequencer User Manual).

1. Skru på PC-en og deretter på ALFexpress[™].
2. Sett inn nedre bufferkammer i apparatet og sett inn gel-kassetten i riktig posisjon. Den skal henge på to metalltapper på hver side av øvre bufferkammer.
3. Koble til vannsirkulasjonsslangene på hver side av gel-kassetten. Press dem godt på slik at det høres et tydelig klikk.

4. Fyll bufferkamrene med 0.6x TBE-buffer (1x TBE-buffer for fragment analyse) til avmerket nivå inne i kamrene.
5. Lukk opp ønsket casebook. Skriv inn navn på prøvene og gjør eventuelle endringer i de eksperimentelle betingelsene.
6. Sett i gang de eksperimentelle betingelsene ved å trykke "Preset".
7. Lukk lokket til ALFexpress[™] og laseren vil begynne å søke gjennom gelen for å finne optimal posisjon (laserverdien bør være på mellom 600-800).
8. Denaturer sekvenseringsreaksjonene ved 95°C i 3 minutter før 4-6 µl appliseres på gelen i rekkefølgen A, C, G og T for hver reaksjon.
9. Ta ut kammen og skyll brønnene med 1x TBE-buffer når gelen har oppnådd ønsket temperatur (55°C). Sett prøvene på så fort som mulig, siden gelen lekker ut urea i bufferen.
10. Sett på elektrodene i øvre og nedre bufferkammer.
11. Lukk lokket og start elektroforesen ved å trykke "Start". Apparatet vil stoppe automatisk etter endt kjøring.
12. Etter endt kjøring kobles elektrodene og vannsirkuleringen fra. Fjern gel-kassetten fra apparatet og legg den på et stabilt underlag. Lukk opp gel-kassetten og fjern gelen. Vask alt fritt for gelrester.
13. Resultatene av elektroforesen blir lagret som *.alx-filer på brukerens område. Og kan analyseres og prosesseres med Sequence Analyser 2.10.

2.3.4 Automatisk sekvensering med MegaBACE

MegaBACE er et automatisk sekvenseringssystem som baserer seg på kjedeterminering ved hjelp av ddNTP. I dette systemet benytter man merkede ddNTP istedenfor merket primer som man bruker i AlfExpress[™]. Hver av de fire ddNTP'ene er merket med to fargestoffer; fluorescein og en av fire ulike rhodamin-farger. Fluorescein har en stor ekstinksjonskoeffisient ved 448 nm som brukes i sekvenseringsinstrumentet. Fluorescein, som fungerer som donorfarge, absorberer energi fra lyset fra laserstrålen og overfører denne energien til rhodamin-akseptorfargen. Denne fargen vil da emitte lys av sin karakteristiske bølgelengde slik at de fire terminatorene kan skilles fra hverandre av en detektor.

Rhodamin-fargene som benyttes er rhodamin 110, rhodamin-6-G, tetrametyl-rhodamin og rhodamin-X.

En fordel med å benytte fargede ddNTP er at man får redusert bakgrunnen av ukorrekte terminerte fragmenter, fordi kun fragmenter som er terminert med en ddNTP vil detekteres. En annen fordel med denne metoden er at når de fire ddNTP'ene er merket med hver sin farge kan man kjøre alt i en reaksjon i stedet for å kjøre en reaksjon for hver av de fire ddNTP.

M13mp18 og primeren som ble benyttet følger med det kommersielle kitet som brukes i MegaBACE-systemet.

Prosedyre:

1. Bland sammen følgende i et 0.5 ml eppendorfrør eller et PCR-rør:

DNA-templat (ssM13 0.2 µg/µl)	2.5 µl
Primer (2 pmol/µl)	2.5 µl
10 x FS-buffer	2.0 µl
dNTP	Her ble det benyttet ulike
ddNTP	mengder.
MQ-vann til 20 µl	
Totalt volum	20 µl

2. Reaksjonsblandingen kjøres i PCR. Benyttet syklusene som var beskrevet i manualen til Thermosequenase-kitet, men elongeringstrinnet ble kjørt ved 72°C istedenfor ved 60 °C.

Trinn 1: 95°C i 2 min
 Trinn 2: 95°C i 20 sek
 Trinn 3: 50°C i 15 sek
 Trinn 4: 72°C i 1 min
 Trinn 5: 39 sykluser av trinn 2-4
 Trinn 6: 72°C i 5 min
 Trinn 7: 4°C ∞
 Trinn 8: slutt.

3. Prøven sentrifugeres gjennom en Sephadex-kolonne før den settes på sekvenseringsinstrumentet.

2.4 Ekspresjon av rekombinante proteiner i *E.coli*

2.4.1 Ekspresjon og produksjon av cellefritt lysat

Native eller rekombinante proteiner kan uttrykkes med ulike typer *E.coli*-bakterier som vertsorganisme. For at dette skal kunne oppnås må genet man ønsker å uttrykke være klonet inn i en ekspresjonsvektor med en regulerbar promoter. *E.coli*-bakterier kan dyrkes til meget høye celletettheter og er derfor gunstig som vertsorganisme ved ekspresjon av proteiner. I denne oppgaven ble det benyttet en modifisert utgave av en metode beskrevet av Pluthero (1993), for ekspresjon og isolering av *Taq* DNA polymerase (Kristiansen, 2000).

Hvis man ikke vet etter hvor mange timer ekspresjonen er på topp, bør man ta uttak ved ulike tidsintervaller, for eksempel hver annen time.

Prosedyre:

Løsningene som ble benyttet er beskrevet i kap. 5.4

1. En bakteriekoloni som inneholder plasmid med rett innskudd overføres til 5 ml LB_{amp100}-vekstmedium og dyrkes overnatt ved 37 °C i en rysteinkubator.

2. 500 µl fra overnattekkulturen overføres til en steril kolbe med 500 ml LB_{amp100}-vekstmedium og dyrkes til OD₆₀₀ ~ 0.8. Deretter tilsettes IPTG slik at konsentrasjonen blir 0.5mM (125mg/L). Før bakteriekulturen dyrkes videre kan det være lurt å ta ut en 0-prøve. Kulturen dyrkes videre ved 37°C i rysteinkubator og uttak gjøres annenhver time i 50ml sentrifugerør. Ved hvert uttak følges følgende prosedyre (til 50 ml bakteriekultur).
3. Bakteriene høstes ved sentrifugering ved 5000 x g i 10 minutter ved 4°C, og bakteriepelletten resuspenderes i 5 ml buffer A (resuspensjonsbuffer).
4. Løsningen sentrifugeres igjen ved 5000 x g i 10 minutter ved 4°C, og bakteriepelletten resuspenderes i 2.5 ml buffer B (pre-lysisbuffer). La løsningen stå i 15 minutter i romtemperatur.
5. Tilsett så 2.5 ml av buffer C (lysisbuffer), bland forsiktig og sett løsning i vannbad som holder 65°C i 1 time.
6. Sentrifuger løsningen ved 3000x g i 15 minutter ved 4°C, og overfør det klare lysatet til et rent rør.
7. Lysatet fortynnes 1:1 med buffer D (lagringsbuffer), og oppbevares i fryser for videre undersøkelse.

2.5 Rensing og oppkonsentrering av proteiner

2.5.1 Fjerning av DNA

Rester av DNA i løsningen kan forstyrre binding av proteinene til kolonnematerialet i ulike kromatografimetoder. Det er derfor viktig at disse restene fjernes før man starter med rensing ved hjelp av kromatografi.

2.5.1.1 Streptomycinsulfatfelling av DNA

DNA felles ut i nærvær av streptomycinsulfat og dette er en enkel og effektiv måte å fjerne DNA i en løsning på. Det man må være oppmerksom på er at enkelte proteiner også kan felles ut i nærvær av streptomycinsulfat. Det er derfor viktig å måle aktiviteten i både grovlysatet, det rensede lysatet og den resuspenderte pelleten (Hamilton, 1974, Lehman, 1974, Setlow, 1974).

Prosedyre:

1. Tilsett 1 del 5 % streptomycinsulfat til 5 deler av grovlysatet under omrøring.
2. La blandingen stå med omrøring i 30 minutter og sentrifuger den deretter ved 10000 rpm i 15 minutter.

3. Hell supernatanten over i en ren beholder. Tilsett ønsket buffer, for eksempel TN-buffer til pelleten slik at denne får samme volum som supernatanten. La pelleten løses over natt.
4. Test aktiviteten i den resuspenderte peletten og det rensede lysatet. Sjekk også grovlysat, rensat lysat og pelleten på en 0.8% agarosegel før videre behandling.

2.5.2 Kromatografi av proteiner

2.5.2.1 Hydrofob interaksjonskromatografi

I hydrofob interaksjonskromatografi (HIK) separeres proteiner ved at de har ulik hydrofobisitet på overflaten, og dermed reagerer ulikt med det hydrofobe kolonnematerialet under polare betingelser.

Kolonnematerialet består ofte av hydrofile forbindelser, som for eksempel krysskoblet agarose, med kovalent bundet hydrofobe grupper, som for eksempel oktyl- eller fenylgrupper.

Som nevnt foregår de hydrofobe bindingene mellom protein og ligand under polare betingelser. Jo mer polare omgivelsene er, jo flere proteiner vil binde seg til kolonnen. Dette varierer også med hva slags ioner som tilsettes. Noen ioner fremmer binding mer enn andre, ioner med såkalt høy utsaltnings effekt, mens andre, kaotrope ioner, hemmer hydrofobe interaksjoner. Dette illustreres av Hofmeisterserien, se figur 2.3. Dette utnyttes ved at man benytter en startbuffer med relativ høy saltkonsentrasjon som fremmer binding til kolonnen, og eluerer proteiner med en elueringsbuffer med lav saltkonsentrasjon. Som regel benyttes en gradient ved eluering, hvor saltkonsentrasjonen gradvis minkes. Man får da eluert ut ulike proteiner, med ulike hydrofobe egenskaper ved ulike saltkonsentrasjoner. De mest hydrofobe proteinene vil da elueres ut sist.

Hofmeisterserien:

	Økende utsaltnings effekt
Anioner:	$\xrightarrow{\text{SCN}^- \text{ I}^- \text{ ClO}_4^- \text{ NO}_3^- \text{ Br}^- \text{ Cl}^- \text{ SO}_4^{2-} \text{ CH}_3\text{COO}^- \text{ PO}_4^{3-}}$
Kationer:	$\xleftarrow{\text{Ba}^{2+} \text{ Mg}^{2+} \text{ Li}^+ \text{ Cs}^+ \text{ Na}^+ \text{ K}^+ \text{ Rb}^+ \text{ NH}^+}$
	Økende kaotropisk effekt

Figur 2.4: Oversikt over usaltnings effekt og kaotropisk effekt til enkelte ioner

I denne oppgaven ble det benyttet HiPrep® 16/10 PHENYL (LOW SUB) fra Amerham Biosciences. Denne kolonnen har en matriks som består av 6 % krysskoblet agarose med kovalent bundet fenylgrupper.

Kolonnen ble benyttet på Äkta-systemet, som er et automatisk system som kan benyttes på en rekke ulike kolonner. Buffere er beskrevet i punkt 5.5.2.1.

Prosedyre:

1. Kolonnen monteres i Äkta-apparatet og ekvilibrerer i henhold til manualen.
2. Prøven appliseres ved hjelp av en superloop.
3. Vask med 2 CV startbuffer. Det som renner rett i gjennom kolonnen tas vare på for senere analyser.
4. Eluer med en gradient som går fra 0-100 % elueringsbuffer over 10 CV.
5. Holder gradienten på 100 % i 2 CV for å få eluert ut rester av materiale som har bundet seg til kolonnen.
6. Kolonnen rekalkibreres eller rengjøres i henhold til manualen.

2.5.2.2 Ionebytterkromatografi

I ionebytterkromatografi blir proteiner separert med hensyn på ladning. Kolonnen har da en stasjonær fase som består av ioniserte syrer (kationbytter) eller baser (anionbytter). Proteiner med motsatt ladning av den stasjonære fasen vil da bindes til kolonnematerialet ved hjelp av ionebindinger. Jo flere ladninger et protein har på overflaten, jo sterkere vil det bindes til kolonnen.

Proteiner med samme ladning som den stasjonære fasen og uladete partikler vil gå rett i gjennom kolonnen.

Ved rensing av et gitt protein er det, når man benytter en ionebytter, viktig å ta hensyn til proteinets isoelektriske punkt, pI. Ved pH under pI er proteinet positivt ladet, og ved pH over pI er det negativt ladet. Dersom man benytter en kationbytter må man sørge for at pH holdes under pI, og dersom man benytter en anionbytter må pH holdes over pI for at proteinet skal binde til kolonnen.

Eluering av proteiner skjer ved hjelp av en saltgradient, en gradvis økning av saltkonsentrasjonen. Når saltkonsentrasjonen øker vil ionene i elueringsbufferen også binde til den stasjonære fasen, og etter hvert utkonkurrere proteinene som allerede er bundet. Proteiner som binder svakest til kolonnen vil da elueres ut først, mens proteiner med flere ladninger som binder sterkere, elueres ved en høyere saltkonsentrasjon. Slik kan man ved hjelp av en gradient få en god separasjon av proteinene i en prøve.

I denne oppgaven ble det benyttet en sterk anionbytter, HiPrep 16/10 Q XL. Bufferen som ble benyttet hadde en pH på 8, noe som antakeligvis er godt over det isoelektriske punktet til polymerasen.

Ekvilibring, kjøring, rengjøring og lagring ble utført i henhold til manualen som fulgte med kolonnen.

Buffere er nærmere beskrevet i punkt 5.5.2.2

Prosedyre:

1. Kolonnen monteres i Äkta-apparatet og ekvilibrerer i henhold til manualen.
2. Prøven appliseres ved hjelp av en superloop.

3. Vask med 2 CV startbuffer. Det som renner rett i gjennom kolonnen tas vare på for senere analyser.
4. Eluer med en gradient som går fra 0-100 % elueringsbuffer over 10 CV.
5. Holder gradienten på 100 % i 2 CV for å få eluert ut rester av materiale som har bundet seg til kolonnen.
6. Kolonnen rekalkibreres eller rengjøres i henhold til manualen.

2.5.2.3 Gelfiltrering

Gelfiltrering, eller eksklusjonskromatografi, separerer proteinene med hensyn på størrelse. Dette oppnås med ett kolonnemateriale som består av små uoppløselige kuler. Disse kulene består av polysakkarider som er bundet sammen i et nettverk med varierende porestørrelse. Det er porestørrelsen som bestemmer separasjonsintervallet til kolonnematerialet ved at molekyler over en viss størrelse ikke trenger inn i porene. Disse vil da gå rett i gjennom kolonnen. Av molekyler som har en molekylvekt som ligger innenfor separasjonsintervallet, vil de mindre molekyler bruke lengst tid på veien gjennom kolonnen. Dette er fordi disse trenger lenger inn i porene i kolonnematerialet, enn større molekyler som bare trenger et lite stykke inn i porene. Store molekyler blir dermed eluert først i gelfiltrering.

I denne oppgaven ble det benyttet Sephacryl S-200 HR fra Amersham Biosciences som kolonnemateriale. Dette gelmaterialet består av allyl dextran krysskoblet med N, N'-methylene bisakrylamid. Dette danner en hydrofil matriks med høy mekanisk styrke. Dextrankomponenten brukes til å kontrollere porestørrelsen. Sephacryl S-200 HR har et separasjonsintervall fra 5000-250 000 Da. Kolonnen som ble benyttet var en XK 26/100 fra Amersham Biosciences.

Bufferer er nærmere beskrevet i kap. 5.5.2.3

Prosedyre:

1. Pakking av kolonnen; kolonnen settes sammen og pakkes i følge manualen som fulgte med kolonnen.
2. Kalibrer kolonnen ved å sette på en blanding av blå dextran, som ekskluderes fullstendig, og K_2CrO_4 , som trenger fullstendig inn i kulene. Mål volumet når blå dextran elueres, V_0 , og når K_2CrO_4 elueres, V_T .
3. Kjøring av prøven:
 - a) Appliser prøven ved hjelp av en superloop.
 - b) Start elueringen og saml opp passende fraksjoner til $V = V_T$.
 - c) Sjekk aktiviteten i fraksjonene, og sjekk aktuelle fraksjoner i SDS-PAGE.

2.6 Proteinbestemmelse ved Lowry-metoden

I denne oppgaven ble det benyttet en modifisert utgave av Lowry-metoden for å bestemme proteinmengde (Eisenthal og Danson, 1992). Metoden baserer seg på at en reagens; Folin Ciocalteu-reagens, danner et blåfarget kompleks i nærvær av proteiner. Blåfargen (745-750nm) er proporsjonal med mengden proteiner. Den aktive komponenten er fosfomolybdenwolfram-blandet syre. Siden metoden lett kan la seg interferere av flere ulike forbindelser, for eksempel EDTA og DTT, blir proteinene først felt ut med trikloreddiksyre (TCA) for å fjerne slike forbindelser. Løsningene er beskrevet i kap. 5.6

2.6.1 TCA-felling av proteinene

De fleste proteiner denaturerer og felles ut i nærvær av sterke organiske syrer som TCA. I løsninger med små mengder proteiner bør proteinene felles ut sammen med en "carrier", som for eksempel deoksyholat (DOC), da dette vil gi en mer fullstendig utfelling.

Prosedyre:

1. 500 µl av proteinprøven (<0.1 mg/ml protein), tilsettes 75 µl 1 % DOC i 0.1 M NaOH. La blandingen stå i romtemperatur i 5 minutter.
2. Tilsett 100 µl 50 % TCA. Bland godt og sett på is i 15 minutter
3. Sentrifuger løsningen ved 13000 rpm i 15 minutter. Kast supernatanten, og løs proteinpelleten i ønsket mengde buffer eller MQ-vann.

2.6.2 Lowry-analysen

Prosedyre:

1. Tilsett 500 µl Lowry-B løsning til det utfelte proteinet. La blandingen stå ved romtemperatur i 10 minutter.
2. Tilsett så 250 µl Lowry-C løsning og bland godt (vortex). La stå ved romtemperatur i 30 minutter.
3. Avles A_{750} i et spektrofotometer. Som blindprøve tilsettes MQ-vann i stedet for proteinløsning. Proteinkonsentrasjonen bestemmes så ut i fra en standardkurve med kjente mengder bovint serum albumin(BSA).

2.7 SDS-PAGE (Polyakrylamidgelelektroforese):

Med elektroforese menes vandring av ladete partikler i en løsning som er under innflytelse av et elektrisk felt. Partiklene vil da vandre mot polen som har motsatt ladning. Vandringshastigheten til den ladete partikkelen vil avhenge av forholdet mellom ladning og masse.

I SDS-PAGE blir proteiner separert med hensyn på størrelse i en polyakrylamidgel. En polyakrylamidgel består av kjeder med polymerisert akrylamid som er krysskoblet med N, N'-metylen-bisakrylamid. Man starter polymeriseringen ved tilsetning av ammonium- persulfat (APS) og N, N, N', N'-tetrametyletylendiamin (TEMED). Dette fører til at de kryssbundete kjedene danner porer hvor proteinene må passere. Porestørrelsen minker med økende mengde akrylamid, og man bør velge en mengde som passer til det proteinet man ønsker å studere. Før proteinene settes på gelen blir de behandlet med en reduserende agent, ditiotreitol (DTT), som bryter eventuelle disulfidbindinger og natrium dodecylsulfat (SDS). SDS er en anionisk detergent som denaturerer proteinene og dekker dem med negative ladninger. Dette gjør at alle proteinene får et likt ladning:masse-forhold slik at de kan separeres kun med hensyn på proteinenes masse. Små proteiner vil bli mindre hindret av porene i gelen og vil dermed vandre raskest i det elektriske feltet.

I dette forsøket blir det benyttet et diskontinuerlig gelsystem. Det vil si at gelen består av to geler, en stacking-gel og en separasjonsgel. Stacking-gelen har som funksjon å samle proteinene i et bånd slik at man får en smal startson. Dette gjøres ved hjelp av glysin og klorioner som finnes i elektroforesebufferen og polyakrylamidgelen. I stacking-gelen som har en pH på 6.7, blir partiklene separert etter ladningstetthet og ikke etter størrelse. Klorionene har størst ladningstetthet og vil vandre fortest, etterfulgt av proteiner. Glysin har minst ladningstetthet ved pH 6.8 og vil vandre sist i feltet. Dette fører til at proteinene danner et smalt bånd som går over til separasjonsgelen. Når prøven kommer over i separasjonsgelen som har en pH på 8.8 vil ladningstettheten til glysin øke og disse ionene vil vandre raskere enn proteinene i gelen. Proteinene blir da ikke lenger "presset" sammen av glysin-ionene, og vil da separeres etter størrelse. De minste proteinene vil da vandre raskest.

2.7.1 Tillaging av geler til SDS-PAGE

Oppskrifter på løsninger og buffere er beskrevet i materialer i kap 5.7

1. Vask glassplatene, spacer og kam med 70 % etanol og MillQ-vann. Tørk av med papir.
2. Monter glassplatene ved å legge spacer i mellom glassplatene og sett på klemmer. Merk av på glassplaten hvor langt ned kammen går.
3. Legg inn en tykk stripe med 0.8% agarose i bunnen hvis det ikke er montert en bunnspacer. La den stivne.
4. Lag separasjonsgel-blanding med ønsket konsentrasjon. Hell gelløsningen forsiktig mellom glassplatene til ca. 1 cm under kammen.
5. Legg forsiktig på et ca. 1 cm tykt lag med vannmettet 2-butanol for å forhindre eksponering mot oksygen fra luften.

6. La gelen polymerisere i ca. 30 minutter
7. Hell forsiktig av 2-butanolen og skyll godt med MilliQ-vann
8. Lag stackingel-blanding og hell gelløsningen oppå separasjonsgelen helt opp til kanten på gassplaten. Stikk kammen ned i gelen.
9. La gelen polymerisere i ca. 30 minutter. Gelen kan lagres i flere dager hvis den pakkes inn i fuktig papir og plast og oppbevares i kjøleskap.

Man kan også benytte ferdiglagede geler. I denne oppgaven ble det benyttet begge deler, men for det meste ferdiglagede geler fra BIO RAD (Se materialer, kap.5.7)

2.7.2 Tillaging av prøver til SDS-PAGE

Prosedyre:

1. Bland proteinløsningen, 3x SDS-PAGE prøvebuffer og MilliQ-vann slik at konsentrasjonen av prøvebuffer blir 1x.
2. Kok prøvene ved 100°C i 3-5min og sett dem på is til de skal settes på gelen.
3. Fest gelen i gelbeholderen og fyll på SDS-elektroforesebuffer slik at det dekker brønnene.
4. Prøvene appliseres ved hjelp av en Hamiltonsprøyte.
5. Elektroforesen kjøres på ca. 80V gjennom stacking-gelen. Deretter økes styrken til ca. 200V gjennom den separerende gelen. Elektroforesen bør utføres på kjølerom for å hindre varmeutvikling i gelen.

2.7.3 Comassie-farging av proteingeler:

Comassie Brilliant Blue er et stoff som binder til proteinene i gelen og kan dermed brukes til å fremkalle båndene i gelen etter elektroforese av proteiner.

Prosedyre:

1. Etter endt elektroforese legges gelen forsiktig i et kar med Comassie Brilliant Blue fargeløsning. Karet settes på ett vippebrett i ca. 4 timer. Lengre tids farging gir bedre følsomhet.
2. Når gelen har ligget lenge nok i fargeløsningen tilsettes avfargingsløsning. Avfargingsløsningen byttes med jevne mellomrom til båndene kommer tydelig nok frem til at man kan ta bilde av gelen i hvitt lys.
3. Gelen kan oppbevares i 7 % eddiksyre i flere dager. Den kan også sølvfarges eller tørkes.

2.7.4 Sølvfarging av proteingeler

Proteingeler kan også fremkalles ved hjelp av sølvnitrat. Dette er en mer sensitiv metode og kan detektere proteinmengder ned til 2 ng. Geler som får for svake bånd etter farging med Comassie Brilliant Blue kan derfor sølvfarges for å få et bedre resultat. Løsningene bør lages nye for hver fremkalling.

Prosedyre:

1. Etter endt elektroforese (evt. farging med Comassie Brilliant Blue) overføres gelen til et kar med fikseringsvæske. Gelen bør ligge i denne løsningen i minimum 30 minutter, men kan ligge der i ukevis. Gelen vil krympe.
2. Gelen vaskes i 15 % metanol i 3 x 5 minutter.
3. Gelen fikseres i 8.3 % glutardialdehyd i 30 minutter.
4. Gelen vaskes i H₂O i minimum 4 x 5 minutter. Gelen bør ligge i H₂O over natten.
5. Gelen inkuberes i nylaget søvløsning i 15 minutter, og vaskes i H₂O i 4 x 5 minutter.
6. Gelen tilsettes nylaget fremkaller og vaskes til båndene har fått passe intensitet. Gelen skylles da raskt i H₂O før tilsetting av stoppløsning. I dette trinnet må gelen observeres da fremkallingen kan gå veldig raskt.
7. Gelen skal ligge 15 minutter i stoppløsningen før den overføres til H₂O eller geltørkerløsning.

2.7.5 Tørrking av proteingeler

Hvis gelen skal oppbevares over lang tid, er det nødvendig å tørke gelen. Det kan være lurt å ta et bilde av gelen før den tørkes.

Prosedyre:

1. Den fremkalte gelen overføres til geltørkerløsning hvor den inkuberes i 15-30 minutter.
2. Fukt et stykke cellofan som er stort nok til å brette rundt gelen. Legg gelen på cellofanpapiret og brett det rundt gelen. Pass på å presse ut luftbobler.
3. Plasser gelen i geltørkeren. Sett på vakumpumpe og varme. Gelen skal ligge i 75°C i 1 time.
4. Når gelen er ferdig skrus vakuomet av og gelen fjernes fra geltørkeren. Gelen bør nå legges i press for at den skal holde seg flat. Dette er spesielt viktig frem til gelen er avkjølt, men det kan også være en fordel og oppbevare gelen i press.

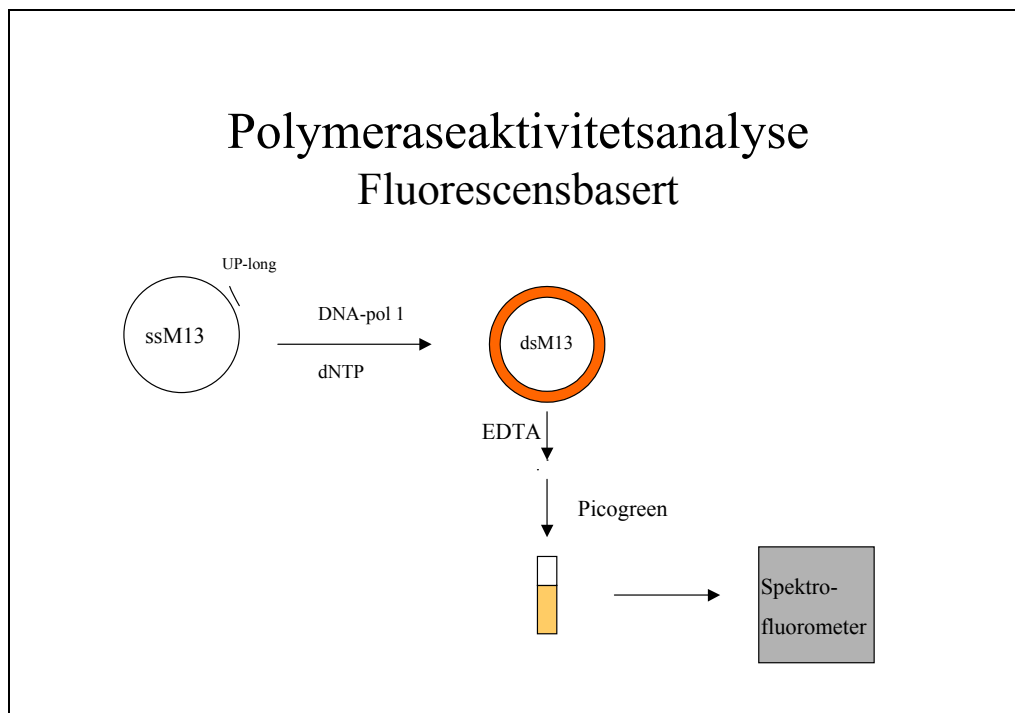
2.8 Måling av polymeraseaktivitet

2.8.1 Fluorescensbasert polymerase-aktivitetsassay

Vanligvis blir DNA polymeraseaktivitet målt ved at radioaktive nukleotider blir inkorporert i DNase-behandlet DNA, såkalt aktivt DNA, etterfulgt av måling av radioaktivitet. I denne oppgaven ble det benyttet en alternativ fremgangsmåte hvor man måler aktiviteten ved hjelp av et fluoriserende stoff. Man benytter det fluoriserende fargestoffet PicoGreen®, som fluoriserer ved binding til dobbelttrådig DNA (Tveit og Kristensen, 2001).

Metoden går ut på at enkelttrådig M13 først blir primet. Deretter blandes primet M13, dNTP og polymerasen sammen. En polymerase aktivitetsbuffer tilsettes også. Denne inneholder blant annet inneholder Mg^{2+} som er nødvendig for at DNA polymerasen skal fungere. Reaksjonen settes så ved ønsket temperatur, her $75^{\circ}C$, i ønsket tid. For å stoppe reaksjonen tilsettes EDTA som binder opp Mg^{2+} -ionene slik at polymerasen blir inaktiv. Deretter settes løsningene på is til fluorescens skal måles.

Når man skal måle fluorescens tilsetter man PicoGreen® fortynnet i TE-buffer, før man måler fluorescensen i et spektrofluorometer. For hver måling blir det også målt en 0-prøve. Denne inneholder alle komponentene, men blir tilsatt EDTA umiddelbart og blir ikke inkubert på varmeblokk. Denne målingen blir trukket fra prøvemålingen for å korrigere for eventuelt dobbelttrådig DNA i løsningen. Da det eksisterer et lineært forhold mellom fluorescensutslag og mengde dsDNA, gir det resulterende fluorescensutslaget et mål på syntetisert DNA. Prinsippet vises i figur 2.5. Løsninger er beskrevet i kap. 5.8.



Figur 2.5: Prinsippet for den fluorescensbaserte polymeraseaktivitetsanalysen.

Figuren viser prinsippet for fluorescensaktivitetsanalysen, der en primet ssM13 blir forlenget ved tilstedeværelse av DNA polymerase I, polymerasebuffer og dNTP. Reaksjonen stoppes ved tilsetning av EDTA, og etter tilsetning av PicoGreen kan fluorescensavlesing i et spektrofluorometer gi et mål på mengde syntetisert dsDNA.

Prosedyre:

1. Tillaging av primet M13: 100 µl ssM13, 24 µl UP-long (1 pmol/µl) og 14 µl 10x Klenow DNA polymerase reaksjonsbuffer blandes. Blandingen kjøres i PCR-maskinen med programmet som kalles *exo-anneal*. I dette programmet varmes prøven opp til 70°C og i 3 minutter, deretter reduseres temperaturen gradvis til 20°C i løpet av 25 minutter.

2. Bland sammen:

10x DNA polymerase aktivitetsbuffer	2.5 µl
dNTP- miks (2 mM)	2.5 µl
Primet M13 (0.2 µg/µl)	1.2 µl
<u>MilliQ-vann</u>	<u>8.8 µl</u>
	15 µl

3. Polymeraseaktivitetsløsningen forvarmes på varmeblokken ved den aktuelle temperaturen i 30 sekunder.

4. 10 µl enzymløsning med ønsket mengde U/µl tilsettes reaksjonsblandingen slik at totalvolumet blir på 25 µl.

5. Reaksjonen las stå på varmeblokken i ønsket tid.

6. Reaksjonen stoppes ved å tilsette 2 µl 0.25 M EDTA og settes på is.

7. Tilsett 1 ml TE-buffer med 1.7 µl PicoGreen til løsningen på is og bland godt. La løsningen stå i 2-5 minutter. Alle prøvene må stå like lenge før de måles. Da PicoGreen er ømfintlig for lys bør man bruke fargede eppendorfrør.

8. Overfør løsningen til en 1 mm kyvette med fire klare sider og avles fluorescensen omgående i et spektrofluorometer der eksitasjonen er 495 nm, og emisjonen avleses ved 520 nm.

9. Mål 0-prøven og trekk denne fra resultatet for å få endelig fluorescensutslag.

2.8.2 Beregning av antall enzymenheter

Ut i fra målingene gjort i det fluorescensbaserte aktivitetsassayet, kan man bestemme antall enzymenheter i lysatet.

En enzymenhet (U) beregnes som mengden enzym som er nødvendig for å syntetisere 10 nmol dsDNA på 30 minutter ved 75°C.

2.8.2.1 Bestemmelse av initialhastighet

For å kunne bestemme antall enzymenheter i en løsning må initialhastigheten være proporsjonal med enzymmengden. Initialhastigheten kan bestemmes eksperimentelt ved å ta tidsuttak av polymeraseaktivitetsmålinger. Man lager da en stor polymeraseaktivitetsløsning, og tilsetter riktig mengde med enzym i forhold til mengde med polymeraseaktivitetsløsning. Deretter tar man ut 25 µl ved ulike

tidspunkter mellom 0 og 30 minutter, og tilsetter 2 µl 0.25 M EDTA, før løsningen settes på is. Deretter måles fluorescens som beskrevet ovenfor, og initialhastigheten kan beregnes som INT/min.

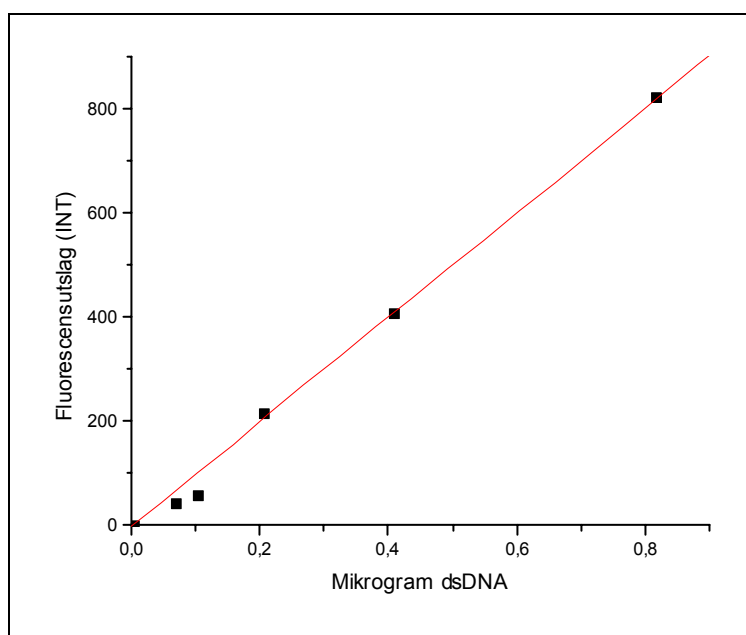
2.8.2.2 Beregning av mengde syntetisert dsDNA og antall enzymenheter

For å beregne mengden dsDNA som har blitt syntetisert, er det nødvendig å benytte en standardkurve med ulike mengder dsDNA plottet mot INT-utslag. Dermed kan man finne mengden dsDNA syntetisert/min. Se figur 2.5.

Når man har funnet mengden dsDNA syntetisert/min, kan man beregne antall enheter i løsningen ved å regne om mengden til antall mol. Da bruker man følgende formel:

$$\text{Mol dNTP inkorporert/min} = \text{Gram syntetisert dsDNA/min} / 324.5 \text{g (molekylvekten til et dNTP)}$$

Antall mol gjøres så om til nmol og ganges med 30 minutter. Man får da antall nmol dsDNA syntetisert på 30 minutter. Antall enzymenheter kan da beregnes ut i fra at 1 enzymenhet syntetiserer 10 nmol i løpet av 30 minutter.



Figur 2.6: Standardkurve for den fluorescensbaserte polymeraseaktivitetsanalysen. Forskjellige mengder dsDNA er tilsatt 1.7 µl PicoGreen i 1 ml TE-buffer, og mengde dsDNA er plottet mot dets fluorescensutslag.

3.0 Resultater

Målet med denne hovedoppgaven var å gjennomføre en mutagenese på *Tma polymerase* I, og teste det muterte enzymet i sekvenseringsreaksjoner og PCR. Mutasjonen som ble innført var den såkalte Tabor-Richardsonmutasjonen, hvor fenylalanin skiftes ut med tyrosin i posisjon 730. Dette har tidligere blitt gjennomført med gode resultater i *Taq*-polymerase, i posisjon 667 som tilsvarer 730 i *Tma polymerase* I. Mutasjonen skal i teorien føre til bedre evne til å inkorporere dideoksynukleotider i en voksende DNA-kjede, en viktig egenskap i DNA-sekvensering.

Det eksperimentelle arbeidet besto av 4 hoveddeler:

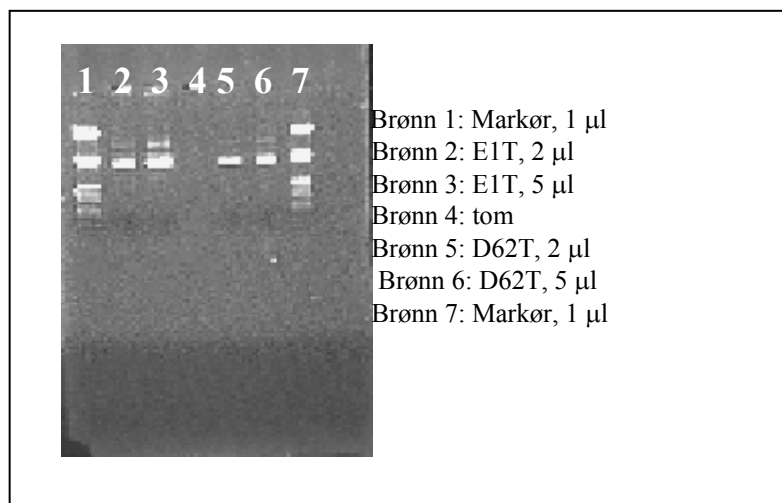
1. Innføring av FY-mutasjonen ved hjelp av setestyrte mutagenese. Mutagenesen utføres ved hjelp av QuickChangeTM Site-Directed Mutagenesis Kit. *Tma polymerase* I er da allerede klonet i en ekspresjonsvektor, pTrc99A.
2. Ekspresjon av nativ og mutert *Tma polymerase* I i *E.coli*, og fremstilling av lysater med eksogen polymeraseaktivitet fra bakterieceller transfektert med pTrc99A-*Tma* og pTrc99A-*TmaFY*.
3. Rensing av nativ og mutert *Tma polymerase* I. Karakterisering av enzymer foretas tryggest med mest mulig rene preparater av enzymet. Enzymene fra forrige punkt skal renses ved bruk av kromatografi i instituttets nye Akta-system.
4. Anvendelse av nativ og mutert *Tma polymerase* I i DNA-sekvensering og PCR. Enzymene bør testes ut både i ALF Express-systemet med fluorescensmerkede primere og i MegaBACE-systemet med merkede dideoksynukleotider. Det vil også være naturlig å sammenligne resultatene med resultater fra tilsvarende sekvenseringsreaksjoner med kommersielle sekvenseringskit.

3.1 Mutagenese av Tma polymerase I

3.1.1 Oppdyrking av kloner E1T og D62T

Genet til Tma polymerase I var ved oppgavens begynnelse allerede klonet og satt inn i en ekspressjonsvektor, pTrc99A. Dette arbeidet ble utført sommeren 2000 av Stephan Duss.

For å fortsette dette arbeidet med Tma polymerase I, ble plasmid fra de to klonene E1T og D62T transformert inn i kompetente *E. coli* DH5 α -celler og dyrket opp i 5 ml LB-medium med ampicillin. Deretter ble det rensede plasmid fra bakteriekulturene, og plasmid-konsentrasjonen ble bestemt. Konsentrasjonen ble bestemt til ca. 45 ng/ μ l. Som markør ble det brukt λ -DNA kuttet med *Hind*III og *Eco*RI.



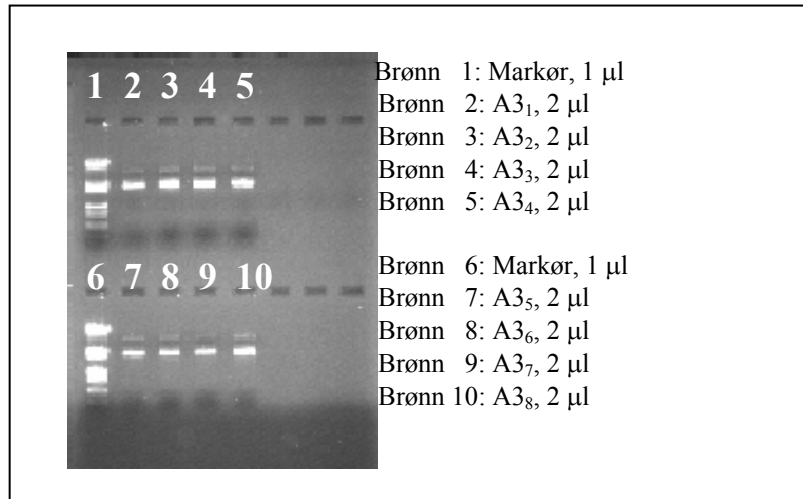
Figur 3.1: Bilde etter rens av plasmid etter oppdyrking av kloner E1T og D62T

3.1.2 Mutagenese

Det ble kjørt mutagenese på 4 ulike konsentrasjoner av plasmidet, henholdsvis 5, 10, 20 og 50 ng av plasmid-DNA, pTrc99A (45 ng/ μ l). Disse ble kalt henholdsvis A1-4. I hver reaksjon ble det så tilsatt reaksjonsbuffer, de to mutageneseprimerne, dNTP-miks og dH₂O til 50 μ l.

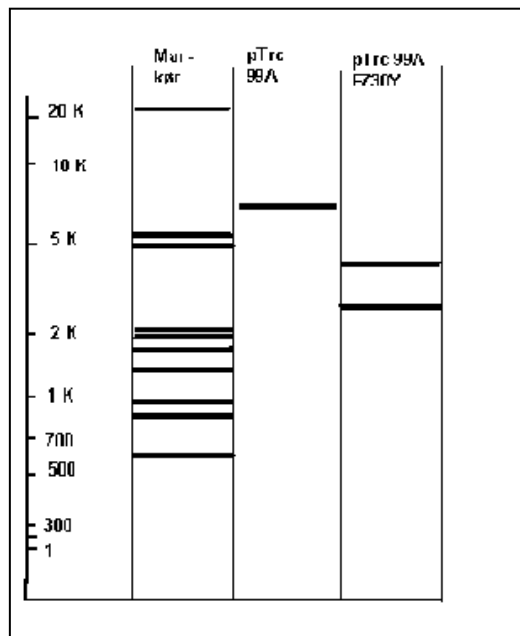
Deretter ble 1 μ l *Pfu* Turbo DNA polymerase tilsatt og reaksjonsblandingen ble kjørt 16 sykluser i PCR-maskinen slik at de to primerne ble forlenget og mutasjonen innført.

1. Etter endt PCR-amplifisering ble reaksjonene tilsatt 1 μ l *Dpn*I restriksjonsenzym, inkubert 1 time og deretter ble 1 μ l av restriksjonsmiksen transformert inn i XL-1 Blue superkompetente celler som fulgte med kittet. Etter oppdyrking på skåler var det ca. 20 % mer vekst i parallell A3, det vil si parallellen med 20 ng plasmid, i forhold til de andre skålene. 8 kolonier fra denne skålen ble derfor dyrket videre i LB-medium tilsatt ampicillin, A3₁₋₈. Det ble så rensede plasmid fra disse bakteriekulturene. Som markør ble det brukt λ -DNA kuttet med *Hind*III og *Eco*RI.



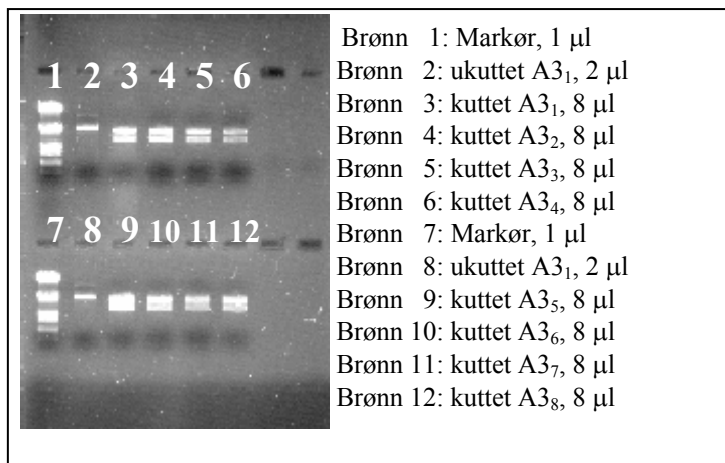
Figur 3.2: Bilde etter plasmidrens etter oppdyrking av koloni A3

For å sjekke at mutasjonen var innført ble plasmidene kuttet med *HpaI*. Når mutasjonen ble innført, ble det også innført et restriksjonssete for *HpaI*. Det finnes fra før et restriksjonssete for *HpaI* i pTrc99A. Dette medfører at hvis mutasjonen er innført får man to fragmenter ved kutting med *HpaI*, men hvis mutagenesen er mislykket får man bare ett fragment ved kutting med *HpaI*.



Figur 3.3: Figur av hvordan mutert og umutert *Tma*-pol vil se ut på en agarose-gel etter kutting med *HpaI*

For å sjekke om mutasjonen var innført ble ca. 200 ng plasmid-DNA kuttet med 10 enheter med *HpaI* ved 37°C i en time. Etter kutting ble både ukuttet og kuttet plasmid-DNA satt på en agarosegel. Se figur 3.4. Da det i alle parallellene ble observert to bånd på gelen etter kutting, viser dette at mutasjonen er innført i alle 8.



Figur 3.4: Bilde etter kutting med *HpaI*

3.1.3 Kontrollsekvensering av genet

Genet for den muterte polymerasen ble sekvensert etter mutagenesen. Dette ble først og fremst utført for kontrollere at det ikke hadde blitt innført noen mutasjoner, utenom den ønskede mutasjonen, i genet. Det ble da benyttet 8 ulike primere; to som var komplementære til vektoren, pTrc99A, i begge retninger, og tre primere til hver tråd i genet. Sekvenseringen ble utført i MegaBACE-systemet.

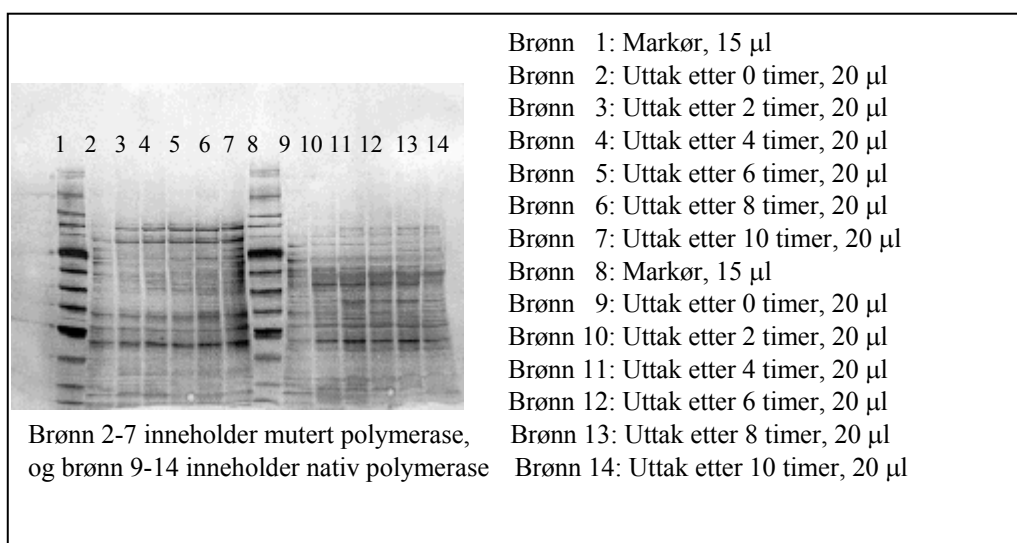
Sammenstilling av den oppnådde sekvensen med sekvensen av *Tma* polymerase I, viste at den ønskede mutasjonen var innført, men at det ikke var innført andre mutasjoner i genet.

3.2 Ekspresjon av nativ og mutert *Tma polymerase* I

3.2.1 Ekspresjon og produksjon av grovlysat

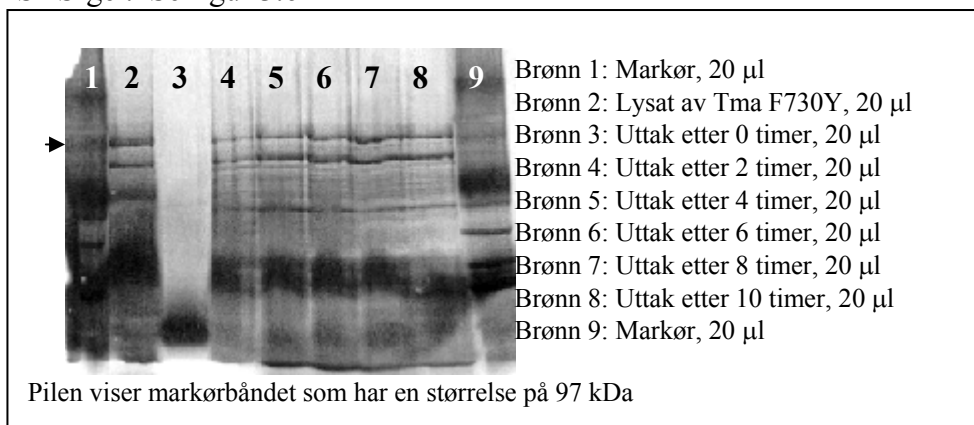
For å uttrykke *Tma polymerase*, ble det benyttet en metode som før har blitt brukt på Taq-polymerase med gode resultater (Engelke, D.R., et al. 1990, Pluthero, F.G., 1993, Urvi, J., et al. 1995). Varmerbehandlingstrinnet ble utført ved 70°C.

Ved ekspresjon av *Tma polymerase* I F730Y ble det benyttet XL-1 Blue super-kompetente celler som fulgte med mutagenesekittet. Da disse cellene vokste ekstremt sakte ble kulturen, når den hadde en OD på 0.28, fortynnet med LB-medium til OD 0.2 og satt på kjølerommet over natten. Neste dag ble så kulturen dyrket opp til OD 0.8, og deretter indusert med IPTG. Etter induksjonen ble det tatt uttak etter 2,4,6,8 og 10 timer. Lysatene ble så kjørt i en SDS-gel. Som markør ble det benyttet Protein Broad Marker fra New England.



Figur 3.5: SDS-PAGE av de fremstilte grovlysatene

Bildet (fig.3.5) viser tydelig at ekspresjonen av den native polymerasen er mye dårligere enn ekspresjonen av den muterte polymerasen. Etter en del eksperimentering ble det oppnådd en vellykket ekspresjon av også den native polymerasen. Ekspresjonen foregikk i kompetente *E.coli* DH5-α celler. Kulturen ble indusert med IPTG 150 mg/l ved en OD på 0.4. Lysatene ble deretter kjørt på en SDS-gel. Se figur 3.6



Figur 3.6: SDS-PAGE av grovlysat av den native polymerasen

3.2 Fluorescensbasert DNA polymeraseaktivitetsassay

3.2.1 Aktivitetsanalyse for den muterte polymerasen

Det første assayet som ble gjort var for å finne ut hvilket lysat som inneholdt mest enzym.

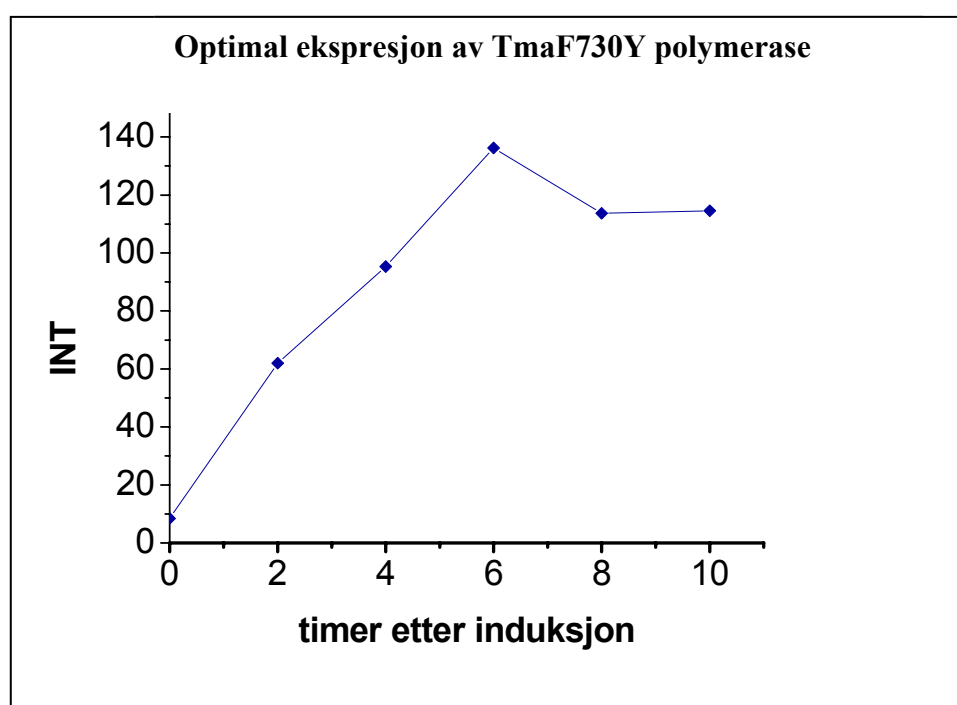
Resultatene viste at det var i uttaket etter 6 timer det var mest enzymaktivitet. Dette lysatet hadde en INT-middelverdi på 136.2, noe som tilsvarer ca. 0.8 U/ μ l. Se tabell 3.1 og figur 3.7. Denne ble da benyttet i videre analyser.

Målingene ble gjort med 0.5 μ l lysat og en reaksjonstid på 3 minutter.

Midlere standardavvik ble beregnet til ± 0.09 .

	INT	INT	INT	INT	INT, middelverdi
Uttak 0 t.	5.3	12.1	7.9	8.7	8.5
Uttak 2 t.	58.0	72.3	57.9	59.8	62.0
Uttak 4 t.	104.3	99.7	87.9	89.2	95.3
Uttak 6 t.	141.1	160.2	123.6	119.6	136.2
Uttak 8 t.	121.0	139.4	99.3	95.2	113.7
Uttak 10 t.	131.9	118.4	104.9	103.4	114.6

Tabell 3.1: Oversikt over målte INT-verdier for den muterte polymerasen



Figur 3.7: Kurve som viser aktiviteten i de ulike tidsuttakene av den muterte polymerasen

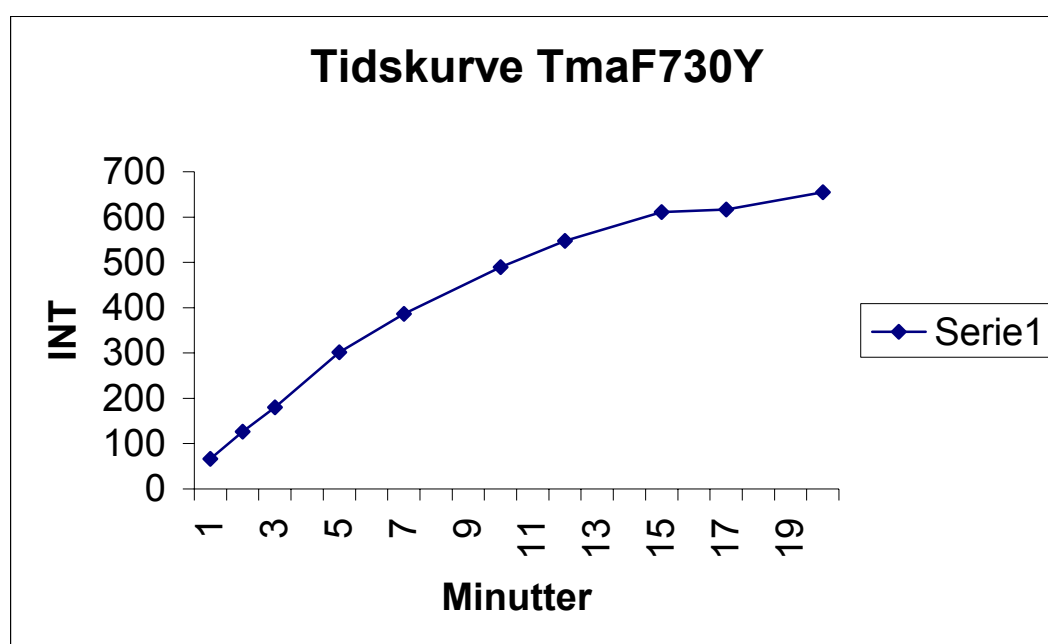
Etter at det var blitt konstantert at det var uttaket etter 6 timer som hadde høyest enzymaktivitet, ble denne benyttet i videre undersøkelser. Det neste som ble gjort var å lage en tidskurve, som beskrevet i metoder under punkt 2.7. Dette gjøres for å kunne bestemme hvor det lineære området befinner seg, slik at man kan benytte dette til å beregne antall enzymenheter.

Målingene ble gjort med 0.5 µl enzymløsning og ble gjort opp til 20 minutter.

Midlere standardavvik ble beregnet til ± 0.12 .

Tid	30 sek	1 min	2 min	3 min	5 min	7 min	10 min	12 min	15 min	17 min	20 min
INT	25.1	61.6	101.3	144.4	288.3	366.7	456.0	515.8	583.8	631.3	676.1
INT	32.0	65.2	131.8	203.9	296.5	399.0	479.4	578.8	642.8	665.4	645.8
INT	37.6	72.2	145.9	192.6	319.2	393.1	532.8	546.6	606.7	627.8	641.5
INT, middel	31.6	66.2	126.3	180.3	301.3	386.3	489.4	547.1	611.1	641.5	654.5

Tabell 3.2: Målte INT-verdier ved lagging av tidskurve for den muterte polymerasen.



Figur 3.8: Tidskurve for den muterte polymerasen

Da det var fastslått at det var etter 6 timer det var mest aktivitet i det produserte lysatet, ble det kjørt en ny ekspresjon for å lage mer lysat. Hele kulturen ble da høstet inn etter 6 timer og det ble laget lysat. Det var da dette lysatet som ble rensset videre. I dette tilfellet ble målingene gjort med 1 µl lysat.

INT ble da målt til 135.1 (middelverdi), noe som tilsvarer ca. 0.4 U/µl.

3.2.2 Aktivitetsanalyse for den native polymerasen

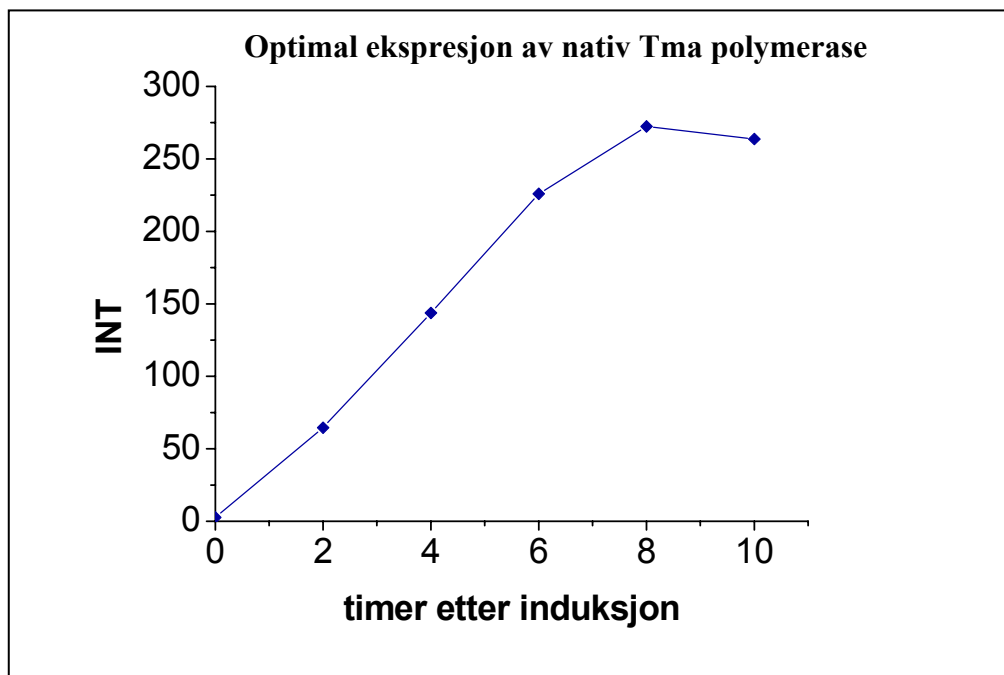
Også for den native polymerasen ble det etter fremstilling av grovlysat gjort en analyse for å finne ut hvilket lysat som inneholdt mest enzymaktivitet. Dette viste seg å være uttaket etter 8 timer. Dette lysatet hadde en INT-middelverdi på 272.4 noe som tilsvarer ca. 0.8 U/ μ l.

Målingene ble gjort med 1 μ l lysat og 3 minutter reaksjonstid.

Midlere standardavvik ble beregnet til ± 0.05 .

	INT	INT	INT	INT, middelverdi
Uttak 0 t.	2.6	2.8	2.4	2.6
Uttak 2 t.	59.6	62.2	72.0	64.6
Uttak 4 t.	167.8	108.3	155.3	143.8
Uttak 6 t.	235.1	224.9	218.1	226.0
Uttak 8 t.	236.7	269.4	311.1	272.4
Uttak 10 t.	218.1	258.7	314.5	263.8

Tabell 3.3: Oversikt over målte INT-verdier for den native polymerasen



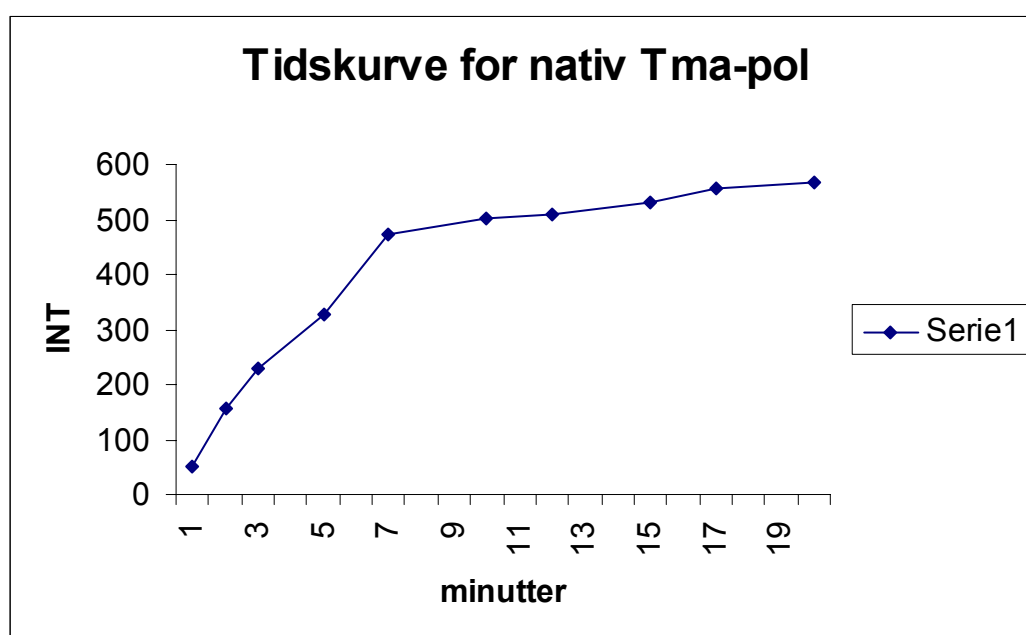
Figur 3.9: Kurve som viser aktiviteten i de ulike tidsuttakene av den native polymerasen

Også for den native polymerasen ble det laget en tidskurve for å kunne beregne antall enzymenheter. Her ble også målingene gjort opp til 20 minutter, men med 1 μ l enzymløsning.

Midlere standardavvik ble beregnet til ± 0.21 .

Tid	30 sek	1 min	2 min	3 min	5 min	7 min	10 min	12 min	15 min	17 min	20 min
INT	6.9	50.0	142.1	203.2	323.8	464.0	481.7	487.7	518.4	527.1	548.6
INT	7.5	56.6	176.2	247.6	328.9	469.2	505.4	511.9	520.0	574.0	562.2
INT	6.8	44.8	152.2	237.1	325.1	485.3	516.2	524.4	554.5	571.2	591.2
INT, middel	7.1	50.5	156.8	229.1	325.9	472.8	501.1	508.0	531.0	557.4	567.3

Tabell 3.4: Oversikt over målte INT-verdier ved lagging av tidskurve for den native polymerasen



Figur 3.10: Tidskurve for den native polymerasen.

3.3 Rensing av nativ og mutert polymerase

Før den native og den muterte polymerasen kunne sammenlignes i sekvensering måtte de renses for at karakteriseringen skulle bli best mulig.

3.3.1 Fjerning av DNA ved hjelp av Streptomycinsulfat

Som beskrevet i punkt 5.1.1 ble lysatet tilsatt 5 % streptomycinsulfat for å fjerne DNA i løsningen.

Utgangspunktet før rensingen var et grovlysat på 37.5 ml. Dette ble tilsatt 5 ml 5 % streptomycinsulfat slik at volumet økte til 42.5 ml. Pelleten ble resuspendert i 5ml TN-buffer.

Da streptomycinsulfat også kan felle ut en del proteiner ble det sjekket aktivitet både i pelleten og i lysatet etter felling.

Aktivitetmålingene er gjort med 1 µl lysat og 3 minutter reaksjonstid

	Mutert <i>Tma</i> polymerase		Nativ <i>Tma</i> polymerase	
	INT	U/µl	INT	U/µl
Grovlysat	135.1	0.42	272.4	0.84
Lysat etter felling	125.4	0.39	212.3	0.66
Resuspendert pellet	23.2	0.06	27.8	0.07

Tabell 3.5: Aktivitetmåling før og etter felling med streptomycinsulfat

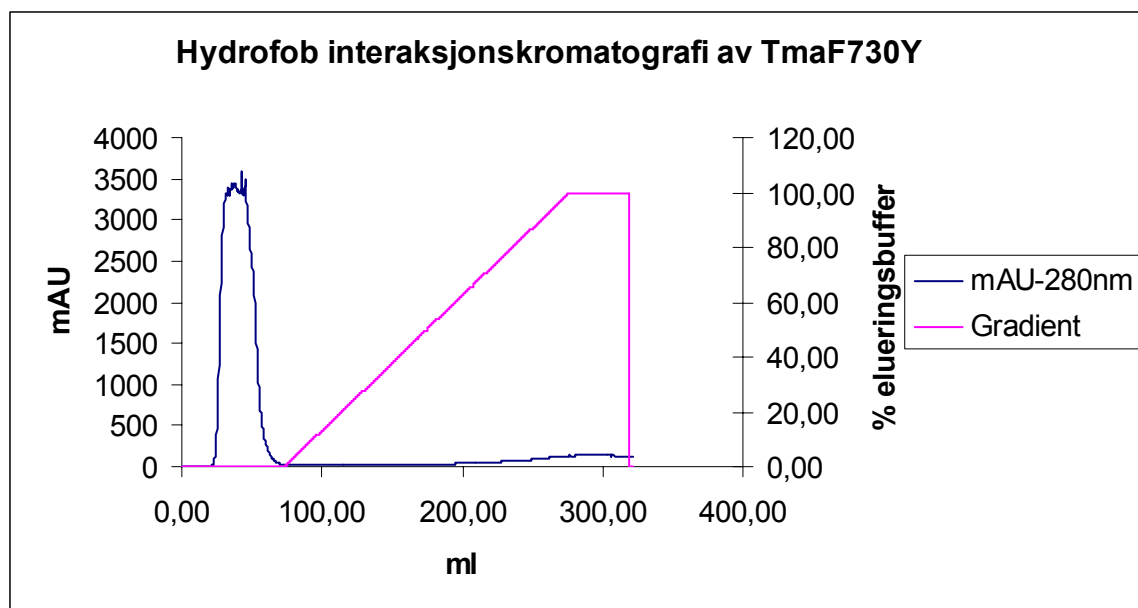
Det ble også malt proteinmengde i lysatet før og etter felling. Før felling var det 1.2 mg/ml protein i begge lysatene. Etter felling med streptomycinsulfat var det henholdsvis 0.6 og 0.7 mg/ml protein i lysatene med mutert og nativ polymerase. Dette bidrar på denne måten i renseprosessen.

3.3.2 Hydrofob interaksjonskromatografi

Den første kolonnen som ble forsøkt i videre rensing av lysatene var HiPrep 16/10 Phenyl (low sub). Rensingen ble utført som beskrevet under punkt 2.5.2.1. Det ble applisert 40 ml av lysatet på kolonnen. Det vil si at det totalt ble applisert 15600 enheter med enzym på kolonnen. Under elueringen av kolonnen ble det målt absorbans ved 280 nm. Dette er fremstilt i figur 3.11.

Fraksjonsstørrelsen var på 3 ml. U-fraksjonen, d.v.s. det som rant rett i gjennom kolonnen ved prøveapplisering og vask av ubundet prøve var på ca. 60 ml.

Etter rensingen ble det sjekket aktivitet i alle fraksjonene som lå innenfor topper i kromatogrammet. I tillegg ble det målt aktivitet på hver 7. fraksjon. Det ble bare utført en parallell av hver prøve for å spare arbeidsmengden. Målingene ble gjort med 10 µl lysat og en reaksjonstid på 3 minutter. Se tabell 3.6



Figur 3.11: Kromatogram etter hydrofob interaksjonskromatografi av *TmaF730Y*. A_{280nm} og % elueringsbuffer er plottet mot antall ml eluert.

ml	0-60	61-63	79-81	101-103	122-124	143-145	164-166	185-187	206-208
U/ μ l	0.016	0	0	0.003	0	0	0	0	0
U tot	960	0	0	9	0	0	0	0	0

ml	227-229	248-250	263-265	268-270	277-279	286-288	298-300	310-312
U/ μ l	0	0	0	0	0.007	0.02	0.03	0.02
U tot	0	0	0	0	21	60	90	60

Tabell 3.6: Aktivitetsmåling etter hydrofob interaksjonskromatografi. Tallene tilsvarer volum. U-fraksjonen, det vil si det som gikk rett igjennom kolonnen, var på 60 ml og de resterende fraksjonene var på 3 ml. Fraksjon nr. 70 tilsvarer da 270 ml i kromatogrammet i figur 3.11.

Det er tydelig ut i fra tabellen at utbyttet etter rensingen er dårlig. I fraksjonen med høyest aktivitet er det totalt 75 U, og i U-fraksjonen er det 960 U (i 60 ml). Dette er ganske lavt i forhold til at det ble applisert over 15000 U.

Siden utbyttet etter rensingen var så lavt ble det forsøkt med dråpedialyse av fraksjonene slik at ikke den høye saltkonsentrasjonen skulle hindre aktiviteten. Men selv etter dialyse var aktiviteten like lav. Det ble også forsøkt å rense U-fraksjonen en gang til på samme kolonne uten at dette ga noen resultater.

Det ble derfor utført en test for å se om den høye ionestyrken, 1M $(NH_4)_2SO_4$, kunne ha ødelagt enzymaktiviteten. Testen ble også utført med ulike konsentrasjoner av NaCl og KCl. Lysatene ble da tilsatt saltene i ulike konsentrasjoner og sto i romtemperatur over natten. Før aktiviteten ble målt ble lysatene dialysert mot 20 mM Tris-HCl, pH 8. Ser ut i fra resultatene i tabell 3.7 at enzymet ikke burde utsettes for så høye salt-konsentrasjoner. Det ble derfor bestemt at en ionebytterkolonne skulle forsøkes som 1. rensetrinn.

Tilsatt salt	Grov-lysat	Ingen	0.5M NaCl	1M NaCl	2M NaCl	0.5M KCl	1M KCl	2M KCl	0.5M $(NH_4)_2SO_4$	1M $(NH_4)_2SO_4$
INT	115.3	101.3	38.0	10.9	2.5	39.7	1.5	1.3	22.3	7.5
U/ μ l	0.35	0.3	0.12	0.03	0	0.12	0	0	0.06	0.02

Tabell 3.7: Aktivitetsmåling etter saltsjekk

3.3.3 Ionebytterkromatografi

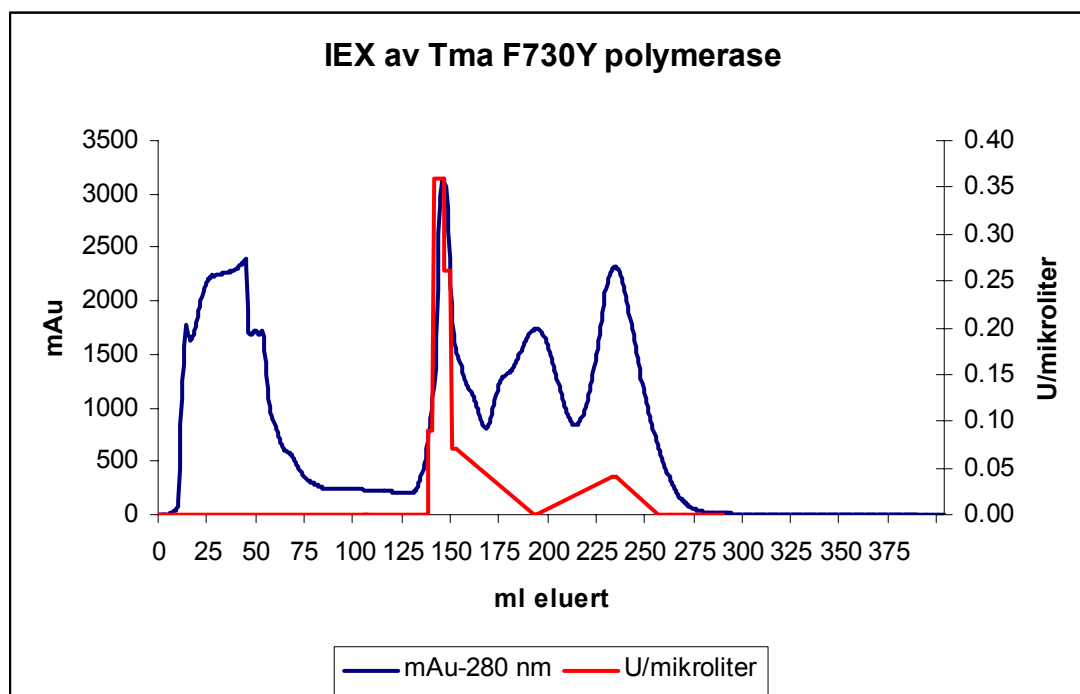
Det neste som ble forsøkt i renseprosessen var en ionebytterkolonne; HiPrep Q XL fra Amersham Biosciences. Rensingen ble utført som beskrevet under punkt 2.5.2.2. Både ved rens av nativ og mutert polymerase ble det applisert 40 ml lysat på kolonnen. Fraksjonsstørrelsen i dette forsøket var på 2.8 ml. U-fraksjonen, det vil si det som rant rett i gjennom kolonnen ved prøveapplisering og vask av ubundet prøve, var her på ca. 80 ml. Etter rensing ble det sjekket aktivitet i fraksjonene som lå innenfor topper i kromatogrammet, se figur 3.12 og tabell 3.8. Fraksjoner med aktivitet ble også undersøkt i SDS-PAGE, se figur 3.13.

3.3.3.1 Ionebytterkromatografi av den muterte polymerasen

Ser på kromatogrammet at det, i tillegg til U-fraksjonen, er tre topper i kurven som tilsvarer absorbans ved 280 nm. Enkelte fraksjoner som lå innefor disse toppene, ble deretter valgt ut til aktivitetmåling. Det ble da benyttet 1 µl lysat og en reaksjonstid på 3 minutter. Disse ble plottet i samme diagram som $A_{280 \text{ nm}}$. Gradienten startet ved 100 ml. Ser på figuren nedenfor at det er bra samsvar mellom og målt aktivitet.

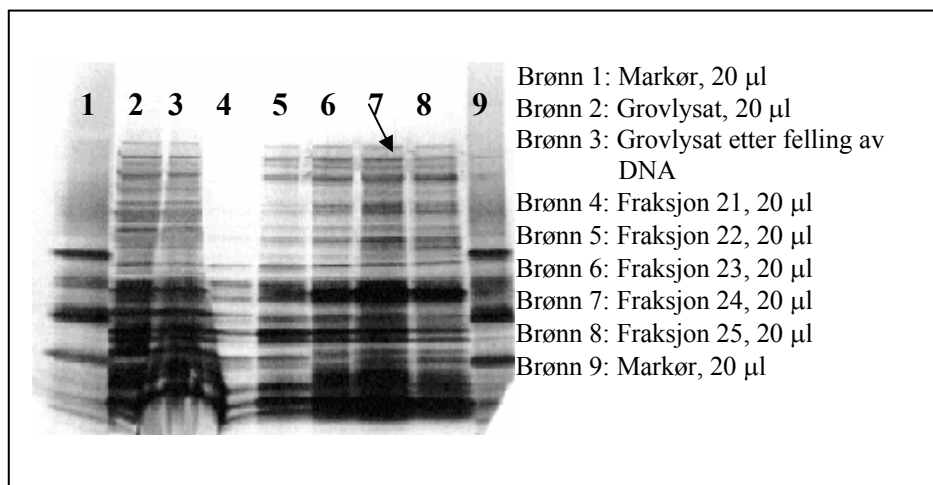
Fraksjonsnr.	U	10	21	22	23	24	25	26	41	56
ml eluert	80	105.2	136.0	138.8	141.6	144.4	147.2	150.0	192.0	234.0
INT	3.9	0	3.9	30.3	114.3	114.7	83.7	24.3	0	12.8
U/µl	0	0	0	0.09	0.36	0.36	0.26	0.07	0	0.04
U total	0	0	0	252	1008	1008	728	196	0	112

Tabell 3.8: Aktivitetssjekk etter ionebytterkromatografi av TmaF730Y.



Figur 3.12: Kromatogram etter ionebytterkromatografi av TmaF730Y. Volumet er målt etter prøveapplisering. $A_{280 \text{ nm}}$ og målt aktivitet er plottet mot elueringsvolum.

Etter aktivitetssjekk ble de aktuelle fraksjonene analysert i SDS-PAGE



Figur 3.13: SDS-PAGE av aktuelle fraksjoner etter ionebytterkromatografi av *TmaF730Y*

Etter ionebytteren ble fraksjon 23, 24 og 25 ført videre til neste rensetrinn. Det ble beregnet at det til sammen i disse tre fraksjonene var ca. 2744 U. Dette tilsvarer 17.6 % av de 15600 U som ble applisert på kolonnen.

Proteinmengden hadde etter ionebytteren sunket fra 0.6 mg/ml til 0.5 mg/ml

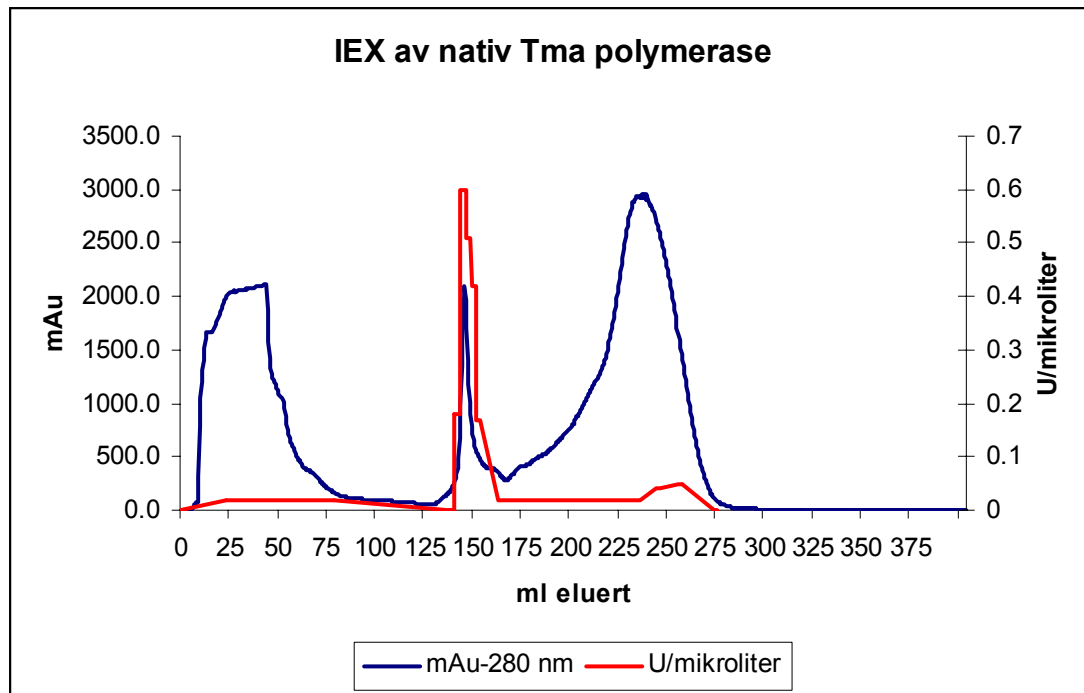
3.3.3.2 Ionebytterkromatografi av den native polymerasen

Ser på kromatogrammet at det ved måling av absorbans ved 280 nm, er to topper i tillegg til toppen ved U-fraksjonen. Det ble deretter målt aktivitet i enkelte fraksjoner som lå innenfor disse toppene. Det ble da benyttet 1 μ l lysat og en reaksjonstid på 3 minutter.

Fraksjonsnr.	U	21	22	23	24	25	26	54	58	62
Volum	0-80	138.8	141.6	144.4	147.2	150	152.8	234	245	256.8
INT	8.1	2.7	55.1	210.0	178.6	146.3	58.3	7.0	12.8	16.5
U/ μ l	0.02	0	0.18	0.60	0.51	0.42	0.17	0.02	0.04	0.05
U total	56	0	504	1680	1428	1176	476	56	112	140

Tabell 3.9: Aktivitetsmåling etter ionebytterkromatografi av nativ *Tma polymerase*

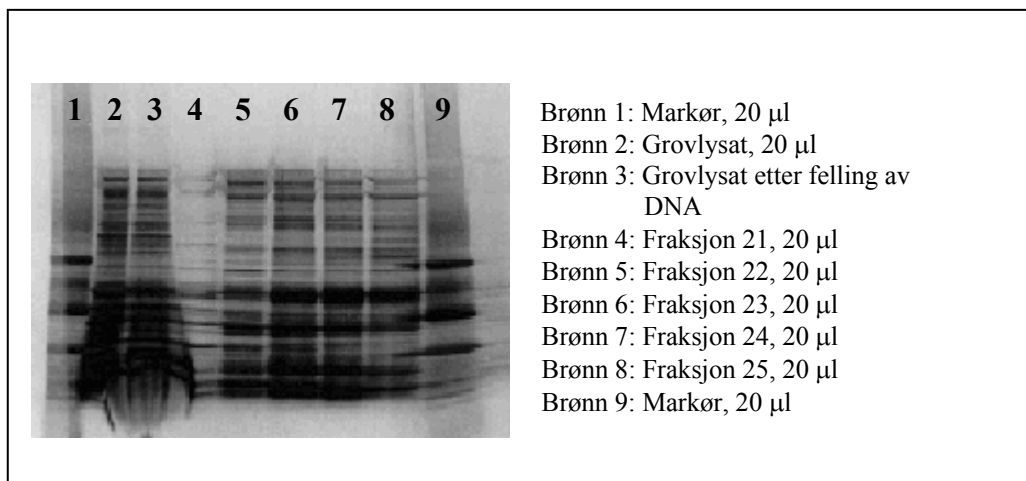
Målt aktivitet ble så plottet mot volum og $A_{280 \text{ nm}}$. Se figur 3.14



Figur 3.14: Kromatogram etter ionebytterkromatografi av nativ *Tma polymerase*. Volumet er målt fra prøveapplisering.

Ser også i dette forsøket at målt aktivitet samsvarer en av toppene som tilsvarer absorpsjons ved 280 nm.

Etter aktivitetsmåling ble aktuelle fraksjoner analysert ved hjelp av SDS-PAGE



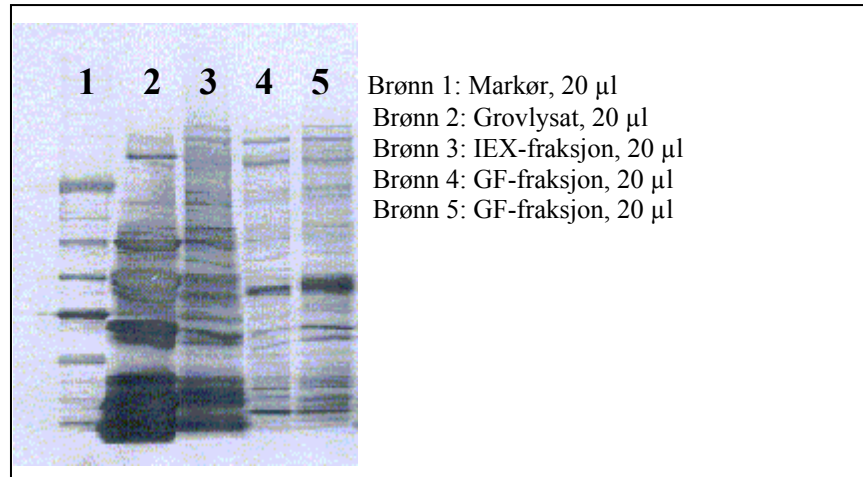
Figur 3.15: SDS-PAGE av aktuelle fraksjoner etter ionebytterkromatografi av nativ *Tma polymerase*

Etter ionebytterkromatografi ble fraksjon 23, 24 og 25 videreført til neste rensetrinn. I denne samlede fraksjonen var det da totalt ca. 4284 U. Dette tilsvarer 16.2 % av aktiviteten som ble applisert på kolonnen, hvor det var totalt ca. 26400 U. Proteinmengden hadde blitt redusert fra 0.7 mg/ml til 0.5 mg/ml.

3.3.4 Gelfiltrering

Fraksjonene med mest aktivitet etter ionebytterkromatografi ble videreført til en gelfiltreringskolonne. Dette var i begge tilfellene fraksjon nr. 23, 24 og 25.

Etter endt gelfiltrering ble det målt aktivitet (resultater ikke vist), og aktuelle fraksjoner ble satt på en SDS-PAGE.



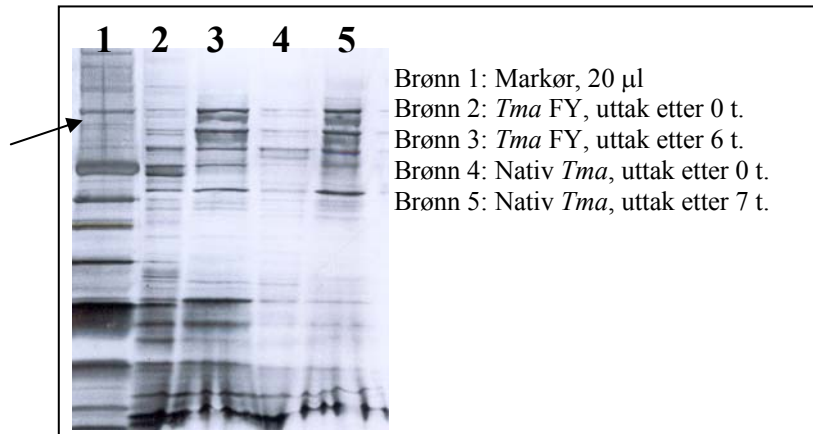
Figur 3.16: SDS-PAGE av aktuelle fraksjoner etter gelfiltrering

Det var helt tydelig på bildet at rensingen ikke har vært vellykket, da det fortsatt var nesten like mange bånd i lysatet etter gelfiltreringen. Båndene tilsvarer proteiner av veldig ulik størrelse, noe som viser at gelfiltreringen ikke har fungert tilfredstillende. Aktiviteten i de aktuelle fraksjonene var også veldig lav. Utbyttet etter gelfiltreringen var på 0.88 og 0.44%, i forhold til grovlysate, for henholdsvis den muterte og den native polymerasen. Dette er veldig lavt med tanke på at fraksjonen fortsatt er såpass uren. Det ble derfor besluttet å gjøre videre analyser på grovlysate. Noe av grovlysatene hadde blitt lagret ved -20°C . Ved aktivitetmåling av disse lysatene viste det seg at aktiviteten hadde sunket betraktelig (resultater ikke vist). Det ble derfor besluttet å kjøre ny ekspresjon av både den native og den muterte *Tma* polymerasen.

3.4 Ny ekspresjon av nativ og mutert polymerase

Da aktiviteten i det gjenværende lysatet hadde blitt kraftig redusert var det nødvendig å kjøre en ny ekspresjon av både den native og den muterte polymerasen. Ekspresjonen ble da kjørt som beskrevet ovenfor med hensyn til induksjonstidspunkt og dyrkningstid.

Lysatene ble deretter kjørt i SDS-PAGE:



Figur 3.17: SDS-PAGE etter ny ekspresjon av nativ og mutert *Tma* polymerase. Pilen viser markørbåndet som tilsvarer 97 kDa.

Det ble også målt aktivitet i disse. Problemer med veldig ujevne resultater i polymerase-assayet gjorde det noe vanskelig å beregne antall enheter i lysatene. Grunnet dårlig tid, ble det ikke brukt så veldig lang tid på dette, og de to lysatene ble anslått til å inneholde ca. 0.15 U/ μ l. Disse lysatene ble så benyttet videre i sekvenseringsforsøk.

3.5 Sekvensering med *Tma*- og *Tma* F730Y-polymerase på Alfexpress™

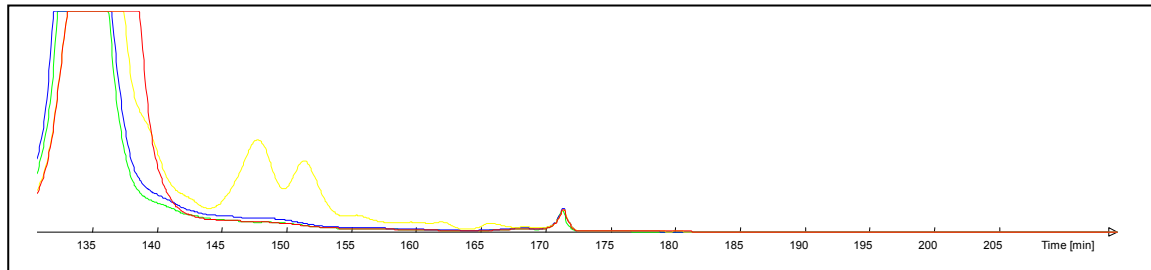
Neste trinn i oppgaven var å teste den native og den muterte polymerasen i sekvensering.

Det ble her benyttet forhold som var optimale for hver av polymerasene, det vil si at den native polymerasen hadde en veldig mye høyere ratio ddNTP/dNTP i forhold til den muterte. Ingen av polymerasene vil kunne fungere under reaksjonsbetingelsene som er optimale for den andre. Det ble tatt utgangspunkt i termineringsløsninger som var tilpasset nativ og mutert *Taq* polymerase I.

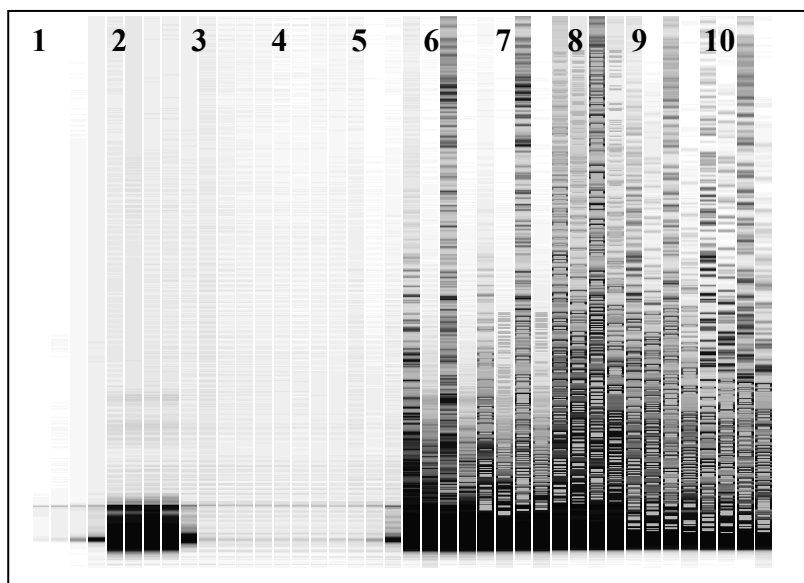
3.5.1 Bekreftelse av mutasjonen

Det at de to polymerasene fungerer under ulike betingelser er en bekreftelse på at mutasjonen har den ønskede effekten. For å vise dette ble den muterte varianten kjørt i en sekvenseringsreaksjon under betingelser som var tilnærmet optimale for den native polymerasen. Det vil si at dNTP-konsentrasjonen var lavere og ddNTP-konsentrasjonen var mye høyere enn det som er optimalt for den muterte varianten.

Som forventet ble det ikke noen sekvensresultater fordi alle fragmentene ble terminert med en gang på grunn av den høye ddNTP-konsentrasjonen. Dette kan ses på utdrag av sekvenssignalene fra AlfExpress (fig.3.18) og man kan se det på selve sekvensgelen (fig 3.19) som inneholder bare korte fragmenter.

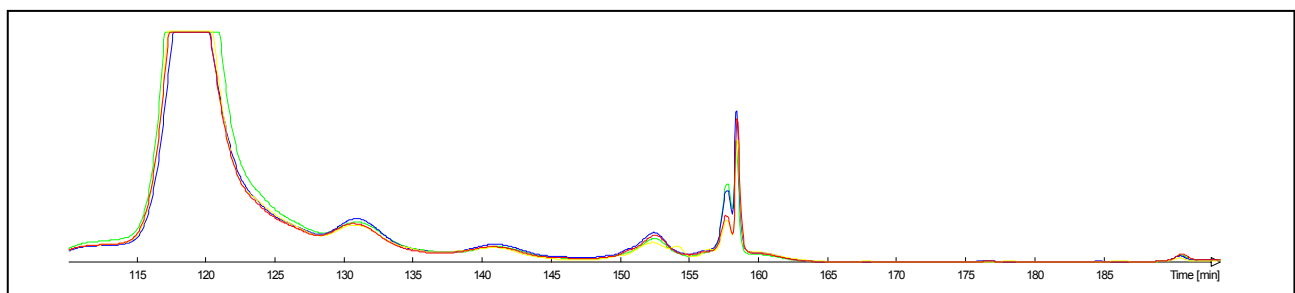


Figur 3.18: Utdrag av sekvenssignalene ved sekvensering av M13mp18 med *Tma* F730Y under betingelser som er tilpasset den native *Tma* polymerasen. Den første store toppen tilsvare primeren.



Figur 3.19: Sekvensgelen fra sekvensering med *Tma*F730Y under native betingelser. *Tma*F730Y er i brønn 2, brønn 3,4,og 5 er tomme og brønn 6-10 inneholder sekvenseringsreaksjoner med enzymer som har fungert under tilpassede betingelser; h.h.v nativ *Tma* polymerase i brønn 6 og 7, og nativ *Taq* polymerase i brønn 8, 9 og 10.

Det ble også gjort et tilsvarende forsøk med nativ *Tma* polymerase med reaksjonsbetingelser som var tilpasset den muterte varianten. Som forventet fikk man heller ikke her noe sekvensresultat, da ddNTP-konsentrasjonen er altfor lav til å overvinne diskrimineringen mot ddNTP av den native *Tma* polymerasen.



Figur 3.20: Utdrag av sekvenssignalene ved sekvensering av M13mp18 med nativ *Tma* polymerase under betingelser tilpasset den muterte varianten.

3.5.2 Optimalisering av reaksjonsbetingelsene

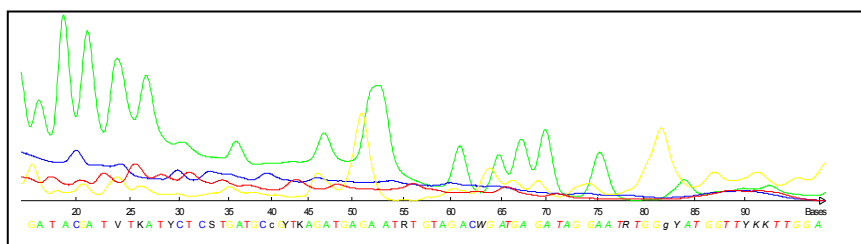
I og med at *Tma* polymerase tidligere ikke har blitt benyttet i sekvensering, var det nødvendig å optimalisere reaksjonsbetingelsene for begge variantene av enzymet. Dette innbar å bestemme hvor mye av enzymløsningen som skulle benyttes i hver reaksjon, og hvilke konsentrasjoner av dNTP og ddNTP som skulle benyttes. I de første reaksjonene ble det benyttet konsentrasjoner som tidligere har blitt benyttet på tilsvarende varianter av *Taq* polymerase, det vil si nativ *Taq* polymerase og *Taq* polymerase FS, som har fått innført Tabor-Richardson mutasjonen.

Ved optimalisering av konsentrasjonsforholdene ser man på sekvenssignalene som blir oppnådd. Målet er at de fire signalene for hver av de fire basene, skal ha mest mulig jevn intensitet. Hvis dette oppnås vil det være lettere for sekvenssoftware å tolke signalene om til sekvens.

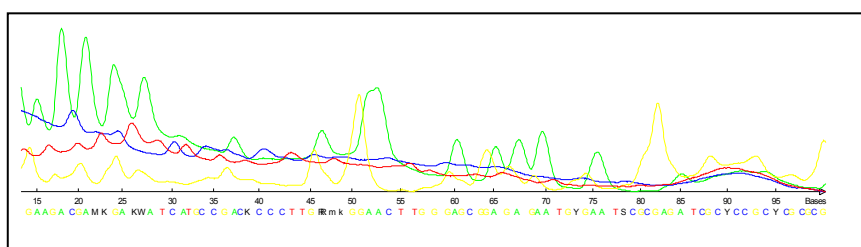
3.5.2.1 Optimalisering av den native polymerasen

Det ble for begge variantene i første omgang utført sekvensreaksjoner med h.h.v 12, 8 og 5 µl enzymløsning.

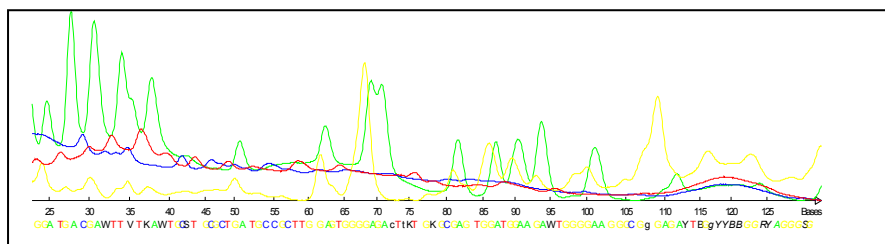
For den native varianten førte dette i alle tilfellene til lesbare sekvenser, men sekvensene var ikke særlig gode. Det er f.eks. helt tydelig at konsentrasjonen av ddCTP og ddTTP er for lav, da signalene for disse to er veldig lave i alle tre tilfellene. Utdrag av sekvenssignalene vises nedenfor.



Figur 3.21: Utdrag av sekvenssignalene etter sekvensering med 12 µl av den native polymerasen.



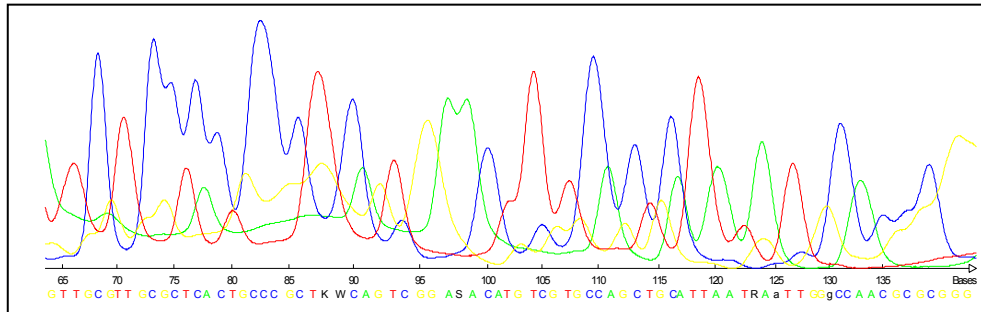
Figur 3.22: Utdrag av sekvenssignalene etter sekvensering med 8 µl av den native polymerasen.



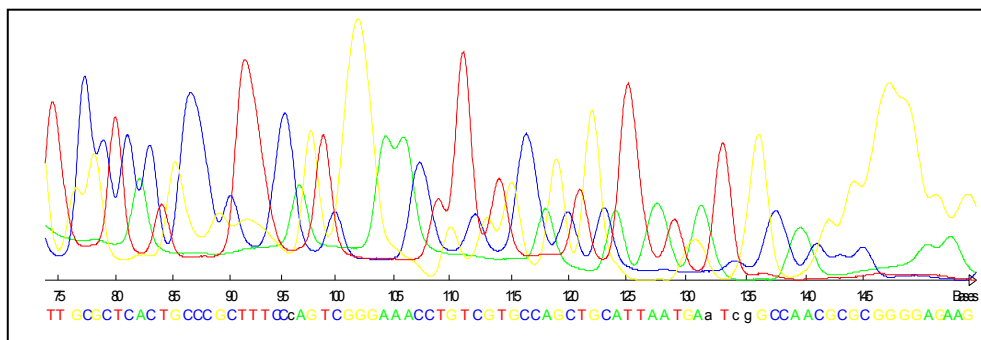
Figur 3.23: Utdrag av sekvenssignalene etter sekvensering med 5 µl av den native polymerasen.

Selv om ingen av de tre sekvensene var særlig gode, gir de omtrent like sekvenser. Dette tyder da på at det ikke er nødvendig med mer enn 5 µl enzym i sekvensreaksjonen.

I neste sekvensering med den native polymerasen ble konsentrasjonen av ddCTP og ddTTP tredoblet i forhold til den første kjøringen, og det ble prøvd ut med 5 og 2 µl enzym. Utdrag av sekvenssignalene er vist i figur 3.24-3.27.

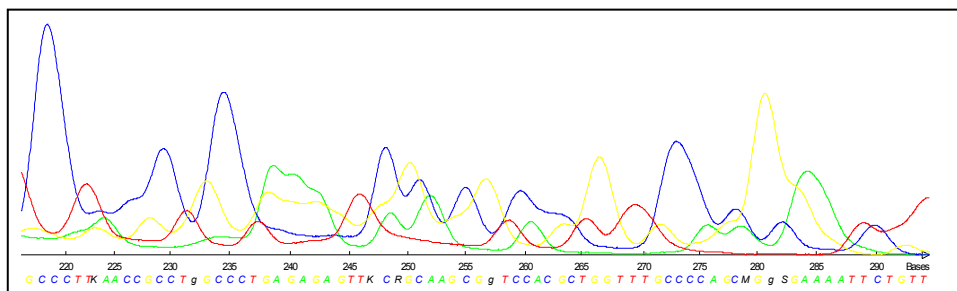


Figur 3.24: Utdrag av sekvenssignalene etter sekvensering med 5 µl nativ polymerase. Utdraget er gjort relativt tidlig i sekvensen.

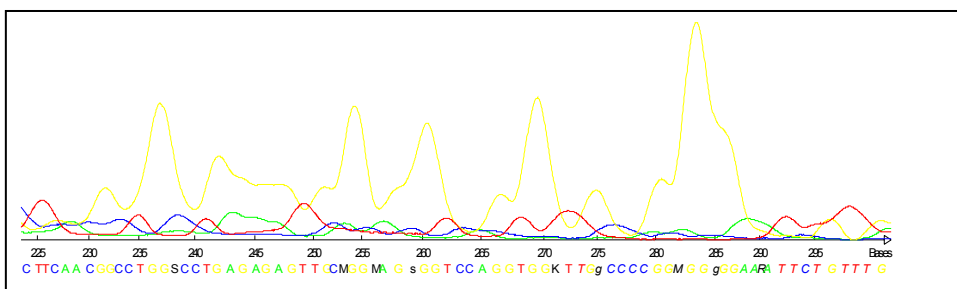


Figur 3.25: Utdrag av sekvenssignalene etter sekvensering med 2 µl nativ polymerase. Utdraget er gjort relativt tidlig i sekvensen.

Utdrag av signalene lenger ut i sekvensene er vist i figurene nedenfor.



Figur 3.26: Utdrag av sekvenssignalene lenger ut i sekvensen etter sekvensering med 5 µl enzym.



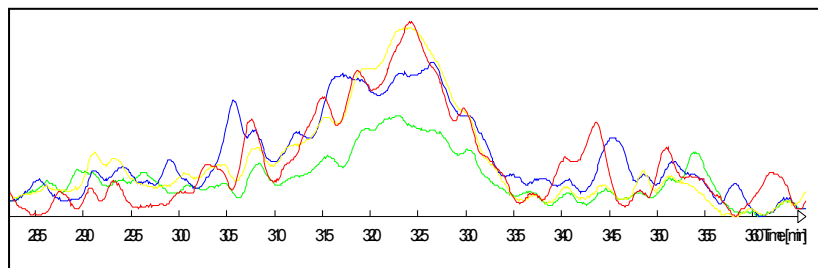
Figur 3.27: Utdrag av sekvenssignalene lenger ut i sekvensen etter sekvensering med 2 µl enzym.

Hvis man ser på sekvenssignalene tidlig i sekvensen (figur 3.24 og 3.25) ser det ikke til at det er noen særlig forskjell mellom reaksjonen med 5 og 2 μl , men lenger ut i sekvensen ser man at signalene etter sekvensering med 2 μl enzym er dårligere enn signalene etter sekvensering med 5 μl enzym (figur 3.26 og 3.27).

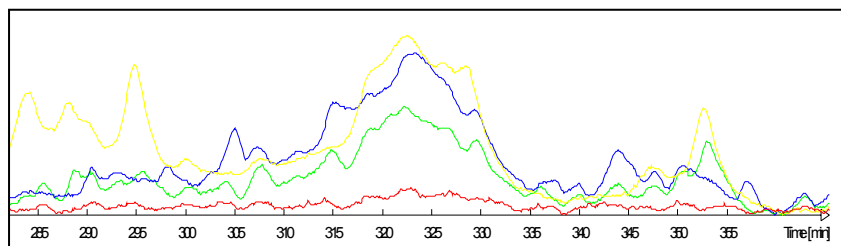
Ut i fra disse resultatene ble det besluttet å benytte 5 μl av den native polymerasen i sekvensreaksjonene. Ut ifra disse resultatene kan det se ut som om konsentrasjonen av ddCTP og ddTTP er noe for høy, og bør muligens reduseres noe.

3.5.2.2 Optimalisering av den muterte polymerasen

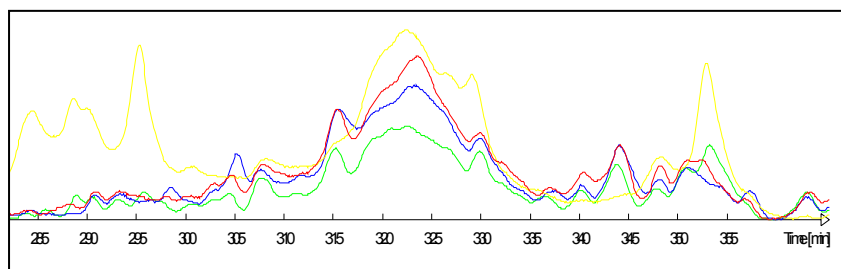
I de første reaksjonene ble det som sagt benyttet konsentrasjoner som er tilpasset *Taq* polymerase som har fått innført FY-mutasjonen. Det ble også her forsøkt med 12, 8 og 5 mikroliter. Sekvenssignalene var i alle tre tilfellene veldig dårlige.



Figur 3.28: Utdrag av første sekvensering med Tma FY polymerase. Her med 12 μl enzymløsning.

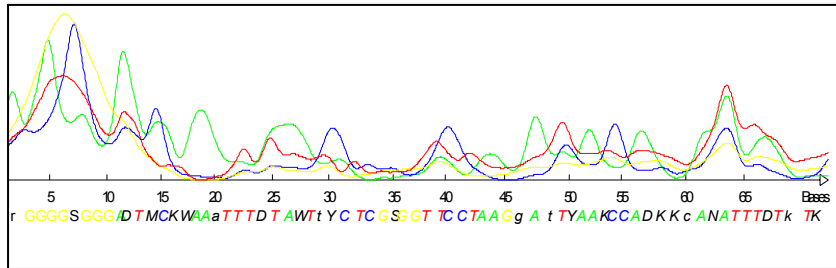


Figur 3.29: Utdrag av første sekvensering med Tma FY polymerase. Her med 8 μl enzymløsning.

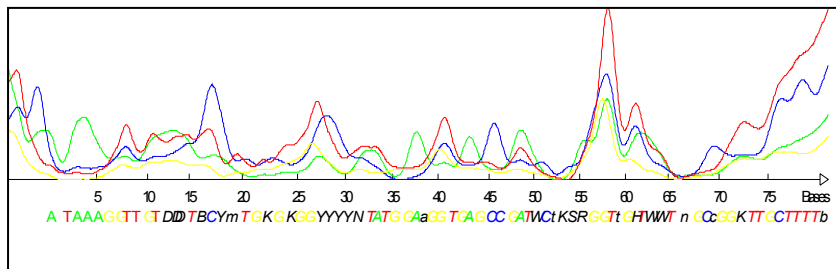


Figur 3.30: Utdrag av første sekvensering med Tma FY polymerase. Her med 5 μl enzymløsning.

Sekvenssignalene er ikke særlig gode, men det ser ikke ut som om det er noen særlig forskjell på om det blitt benyttet 12, 8 eller 5 μl enzymløsning. Det ble derfor i neste optimaliseringsforsøk prøvd ut med 5 og 2 μl . Når det gjelder forholdet mellom dNTP og ddNTP tyder det at signalene er veldig svake på at konsentrasjonen av ddNTP kan være for lav. I neste forsøk ble derfor ddNTP-konsentrasjonen doblet, d.v.s. at det ble benyttet 10 μM i hver stoppløsning.

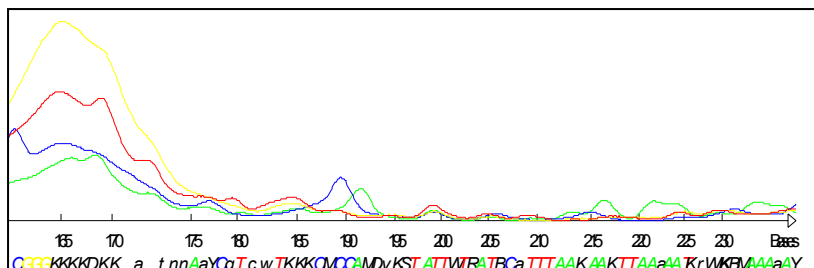


Figur 3.31: Utdrag av andre sekvensering med Tma FY polymerase. Her med 5 µl enzymløsning.

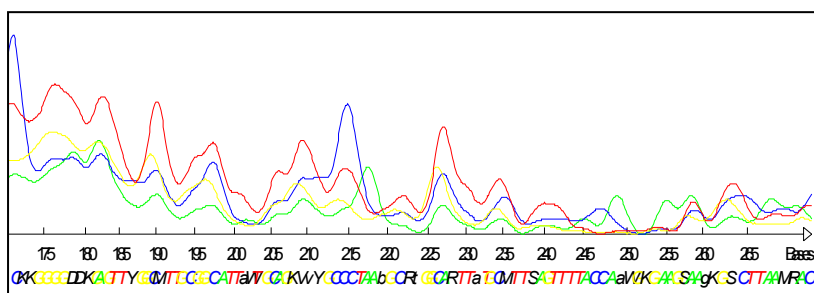


Figur 3.32: Utdrag av andre sekvensering med Tma FY polymerase. Her med 2 µl enzymløsning.

Det ble observert at sekvenssignalene med 2 µl enzymløsning var noe bedre lenger ut i sekvensen. Se figur 3.33 og 3.34. Det ble derfor benyttet 2 µl i videre forsøk.



Figur 3.33: Utdrag av sekvenssignalene lenger ut i sekvensen med 5 µl enzym



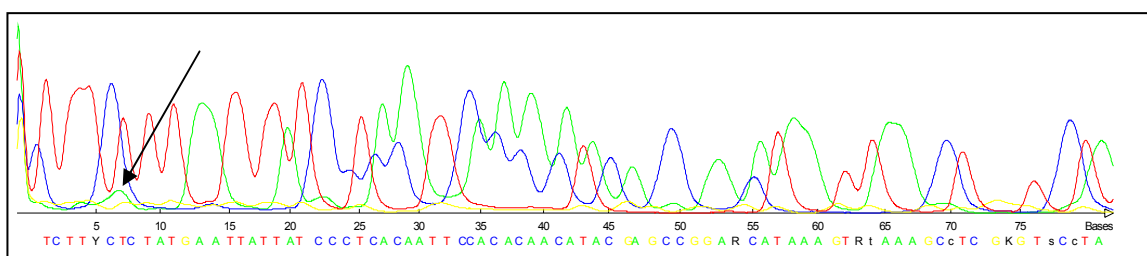
Figur 3.34: Utdrag av sekvenssignalene lenger ut i sekvensen med 2 µl enzym

Sekvenssignalene er fortsatt ikke særlig gode, men da den muterte varianten i videre forsøk skulle testes i på MegaBACE-systemet, og det antakeligvis ville være nødvendig med ytterligere optimalisering for å tilpasse polymerasen til de fluorescensmerkede dideoksynukleotidene, ble det ikke foretatt videre optimalisering på Alfexpress™ ved dette tidspunktet.

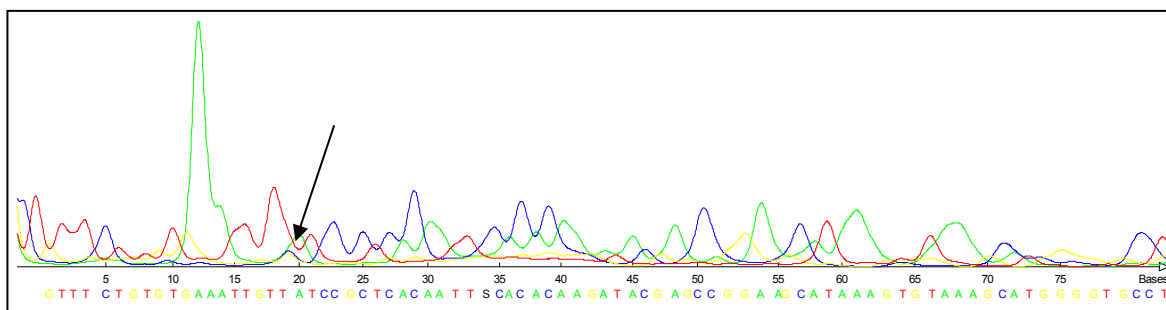
3.5.3 Sammenligning av *Tma* polymerase og *Taq* polymerase

Siden den native *Tma* polymerasen ga uventede bra sekvenssignaler var det interessant å sammenligne denne med den native *Taq* polymerasen. Begge disse polymerasene diskriminerer mot ddNTP.

Et av problemene til *Taq* polymerase er at den ofte gir sekvenssignaler med ujevn intensitet, slik at noen av toppene blir veldig lave i forhold til andre, og dermed vanskelig for software å tolke. Det ble derfor gjort en sammenligning av nativ *Taq* og *Tma* polymerase, for å se om bruk av *Tma* polymerase førte til bedre sekvenssignaler. Resultatene av disse sammenligningene viste at *Tma* polymerase ikke fungerer bedre en *Taq* polymerase. Det ser ut som om sekvenssignalene etter bruk av *Tma* polymerase har flere slike topper enn sekvenssignalene etter bruk av *Taq* polymerase. Konsentrasjonen av ddCTP og ddTTP er i disse forsøkene redusert med en tredjedel i forhold til siste optimalisering.



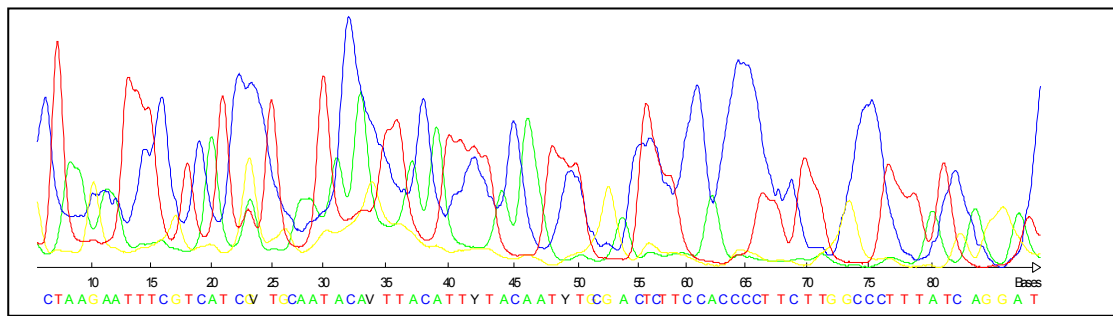
Figur 3.35: Utdrag av sekvenssignalene fra sekvensering av M13 med nativ *Taq* polymerase. Pilen peker på en lav topp som er typisk for problemet til denne polymerasen og som er vanskelig for sekvenseringssoftware å tolke.



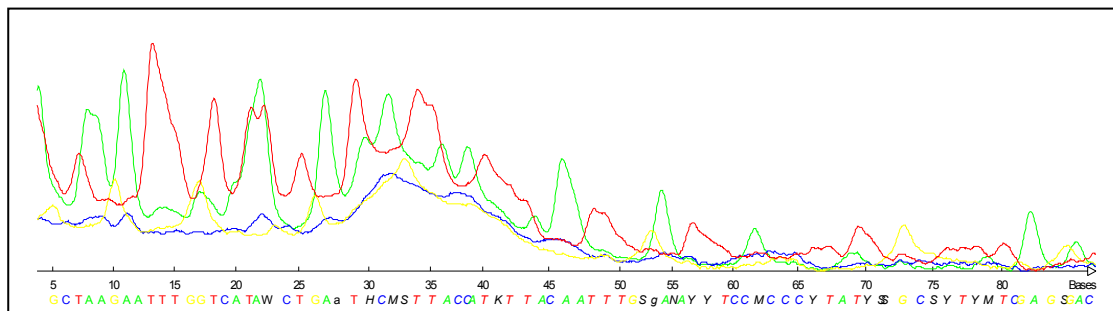
Figur 3.36: Utdrag av sekvenssignalene fra sekvensering av M13 med nativ *Tma* polymerase. Pilen peker på en lav topp. Figuren viser at *Tma* polymerase har samme problemet som *Taq* polymerase.

Ved nærmere gjennomgang av sekvensen ble det observert at de to polymerasene ga ulike sekvenssignaler, det vil si at det ble tolket ulik base i samme posisjon. Dette ble da sammenlignet med den korrekte sekvensen av M13, og det viste seg da at det var *Taq* polymerase som ga den rette sekvensen. I flere posisjoner hadde også G-topper blitt borte fra sekvensen med *Tma* polymerase, mens der de to polymerasene hadde ulike baser hadde *Tma* polymerasen i flere tilfeller satt inn en G istedenfor både C og A.

Siden M13 er et veldig lett templat å sekvensere, ble de to polymerasene også prøvd ut på et vanskeligere templat. Brukte da pGem-plasmidet som er mer komplekst enn M13, for å se om *Tma* ga bedre resultater enn *Taq* på vanskeligere templat. Også her viste det seg at *Taq* polymerase ga bedre resultater enn *Tma*. Figur 3.37 og 3.38.



Figur 3.37: Sekvenseringssignaler fra sekvensering av pGem med nativ *Taq* polymerase



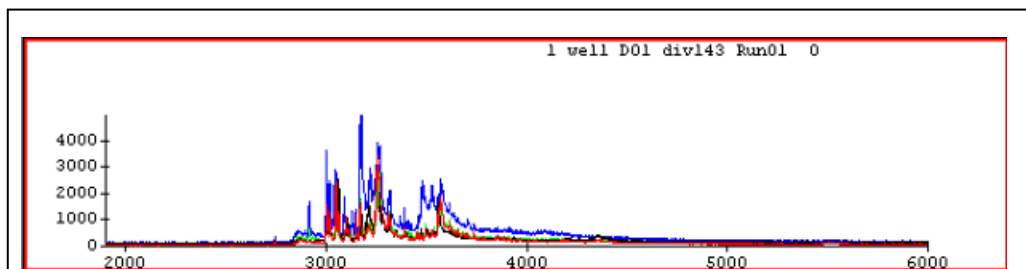
Figur 3.38: Sekvenseringssignaler fra sekvensering av pGem med nativ *Tma* polymerase

Det er også her ganske tydelig at *Tma* polymerase gir dårligere resultater enn *Taq* polymerase. Dette viser at ikke *Tma* polymerase, i hvert fall ikke den native varianten, egner seg særlig godt som sekvenseringsenzym.

3.5.4 Sekvensering med *Tma* polymerase FY i MegaBACE-systemet

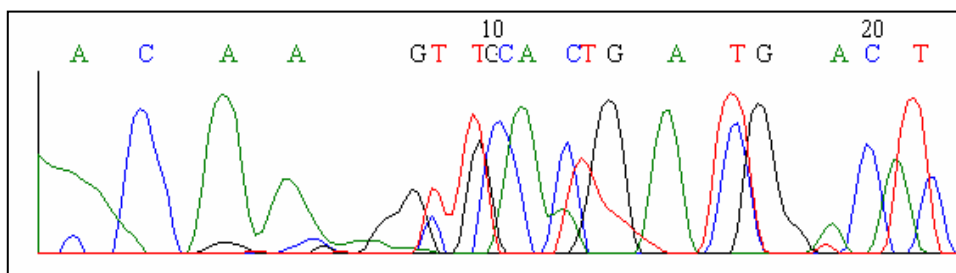
Systemer som MegaBACE som benytter fluorescensmerkede ddNTP, er det som stort sett blir benyttet til sekvensering. Det var derfor interessant å forsøke *Tma* polymerase FY i dette systemet. Det ble da benyttet de samme fluorescensmerkede dideoksynukleotidene som vanligvis brukes i det kommersielle kitet. Det første som måtte gjøres var å finne passende konsentrasjoner av ddNTP og dNTP. Det ble da tatt utgangspunkt i konsentrasjonene som ble benyttet på Alfexpress™, men ddNTP-konsentrasjonen ble doblet. Dette fordi disse nukleotidene har store fluorescensgrupper festet til seg, og det ble antatt at polymerasen ville ha større vanskeligheter med å inkorporere disse enn vanlige ddNTP. Det ble også i disse sekvenseringsreaksjonene benyttet M13 som templat.

I denne første kjøringen ble det kun oppnådd signaler for et veldig kort segment i begynnelsen av sekvensen. Signalene her var veldig sterke. Dette kunne tyde på at konsentrasjonen av ddNTP var for høy. Se figur 3.39.



Figur 3.39: Figuren viser rådata etter sekvenskjøring på MegaBACE med *Tma* FY. X-aksen viser tid mens Y-aksen beskriver intensiteten av signalene.

Ved nærmere ettersyn av sekvensen, ser man at signalene heller ikke er gode, de er ujevne, og det kan se ut som om noen topper forsvinner, særlig noen av G-toppene ser ut til å ha blitt nesten borte en del steder. Se figur 3.40. Ved sammenstilling med M13-sekvensen var det ingen likheter mellom disse to sekvensene.

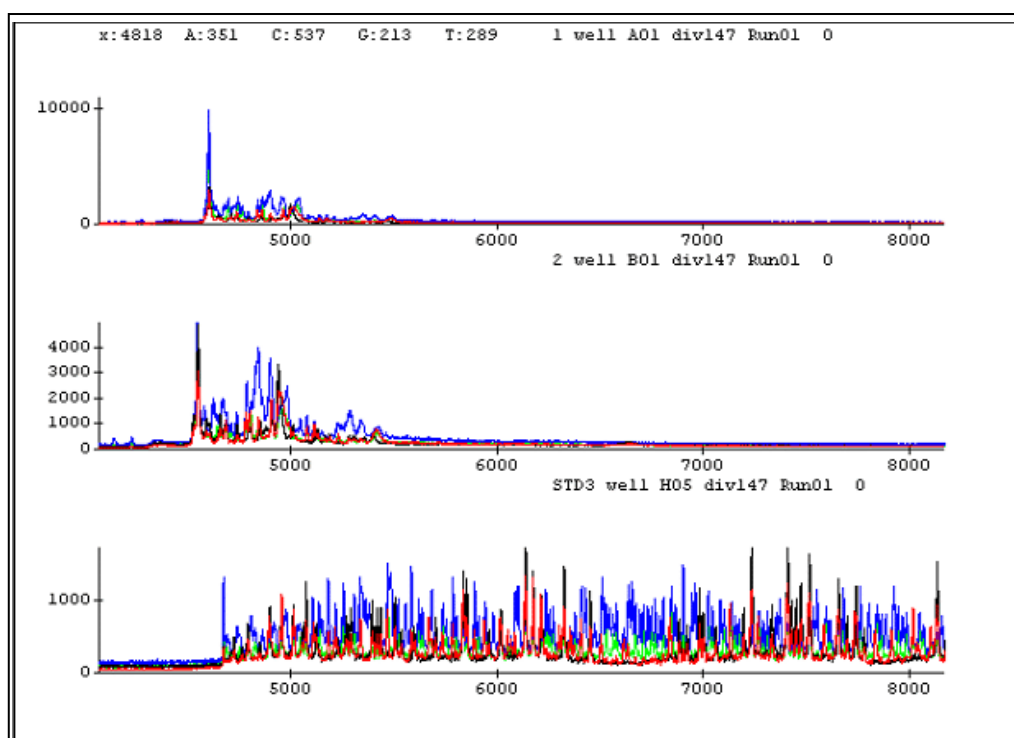


Figur 3.40: Utdrag av sekvenssignalene ved sekvensering av M13 på MegaBACE med *Tma* FY

I neste kjøring var ddNTP-konsentrasjonen den samme som forrige gang, men konsentrasjonen av dNTP ble doblet, da dette burde føre til en lenger sekvens. Det vil si at det ble benyttet 1.43 μM ddNTP og 142.8 μM dNTP.

I tillegg ble det benyttede templatet parallelt sekvensert med det kommersielle kitet, slik at disse to reaksjonene kunne sammenlignes.

Også i dette forsøket var sekvensen ekstremt kort og signalene var sterke i forhold til signalene i reaksjonen med det kommersielle kitet. Dette tyder på at ddNTP-konsentrasjonen fortsatt er for høy. Se figur 3.41.



Figur 3.41: Rådata etter sekvensering av M13 med både *Tma* FY (de to øverste kurvene) og med det kommersielle kitet (nederste kurve).

Ser tydelig at signalene ved bruk av *Tma* FY er veldig mye kortere og veldig mye sterkere enn signalene fra den kommersielle polymerasen. I det ene tilfellet er enkelte av signalene nesten ti ganger sterkere for *Tma* FY, enn for den kommersielle polymerasen. Ved å sekvensere M13-templatet også med den kommersielle polymerasen ble det utelukket at det var noe galt med templatet som ble benyttet i

forsøkene. Det ble benyttet samme templat- og primerkonsentrasjoner i begge reaksjonene. Sekvensene som ble tolket var heller ikke i dette forsøket M13-sekvens, bortsett fra den som var sekvensert med det kommersielle kitet.

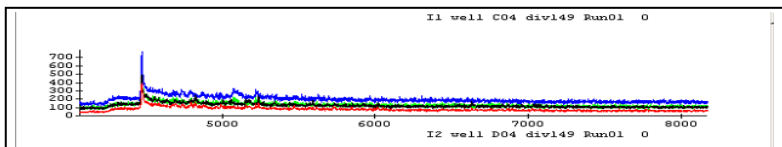
I neste forsøk ble dNTP-konsentrasjonen doblet og ddNTP-konsentrasjonen halvert. Det vil si at reaksjonene ble kjørt med 0.73 μM ddNTP og 300 μM dNTP. Til tross for dette, var sekvensen fortsatt kort og signalene var fortsatt sterke.

Det ble da bestemt å lage en fortynningsrekke med 5 ulike konsentrasjoner av ddNTP. Alle reaksjonene inneholdt som følger:

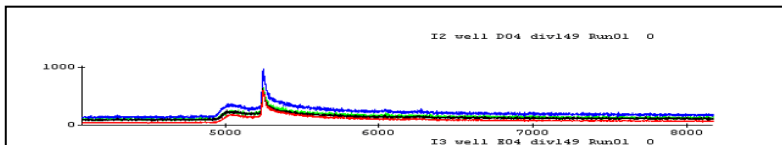
- 500 ng DNA-templat
 - 5 pmol universalprimer
 - 2 μl 10x FS-buffer
- og:

1. 300 μM dNTP og 0.2 μM ddNTP
2. 300 μM dNTP og 50 nM ddNTP
3. 300 μM dNTP og 12.5 nM ddNTP
4. 300 μM dNTP og 3 nM dd NTP
5. 600 μM dNTP og 0.2 μM ddNTP

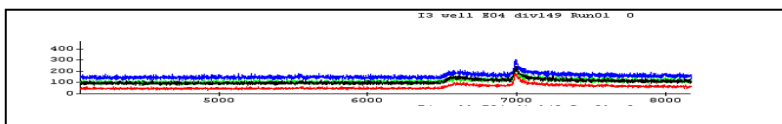
Rådata fra disse fem prøvene ses i figurene nedenfor.



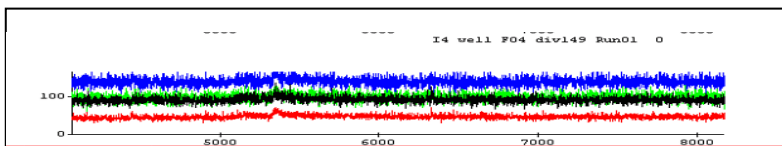
Figur 3.42: Fortynning 1



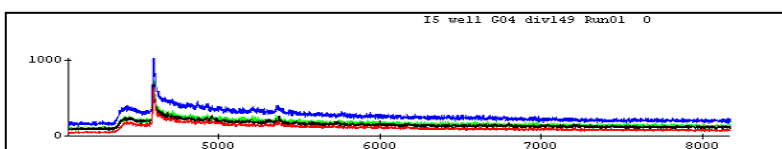
Figur 3.43: Fortynning 2



Figur 3.44: Fortynning 3



Figur 3.45: Fortynning 4



Figur 3.46: Fortynning 5

I parallellene 2 og 4 greide ikke sekvenseringsystemet å tolke noen sekvens i det hele tatt. Dette var ikke overraskende med hensyn til parallell 4, hvor konsentrasjonen av ddNTP var ekstremt lav, bare 3 nM. Mer overraskende var det at det ble tolket sekvens i fortynning 3, men ikke i fortynning 2, da ddNTP-konsentrasjonen var lavere i fortynning 3. Den beste sekvensen ble oppnådd i fortynning 5, hvor dNTP-konsentrasjonen var doblet, det vil si 600 μM og ddNTP-konsentrasjonen var på 0.2 μM . Allikevel ser man på rådata at det er en topp i starten av sekvensen og at denne fort går nedover. Problemet med programvare for utledning av sekvens fra kromatogrammer, kan være at de tolker sekvens ut i fra noe som ikke er sekvens, men bakgrunn. Ved nærmere sammenligning med sekvensen til M13 ble det bekreftet at dette ikke var samme sekvens. Sekvensen er da bare tolket ut i fra bakgrunnen. Uansett gir ingen av fortynningene noe gode resultater. Det kan man lett se ved å sammenligne kurvene med kurven som er oppnådd ved sekvensering med det kommersielle kitet.

I og med at ingen av forsøkene på MegaBACE var vellykkede i den forstand at det ble oppnådd M13-sekvens, finnes det ikke noe grunnlag for å sammenligne *Tma* polymerase med det kommersielle kitet.

4.0 Diskusjon

4.1 Oppsummering av resultatene

I denne oppgaven ble det utført en mutagenese av DNA polymerase I fra *Thermotoga maritima*. Genet for denne polymerasen var allerede klonet inn i en ekspresjonsvektor; *pTrc99A*. Det ble utført setestyrte mutagenese for å substituere fenylalanin i posisjon 730 med tyrosin. Dette ble utført med QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene). Mutasjonen ble påvist ved kutting med *HpaI*. Mutasjonen ble også påvist ved sekvensering. Hele genet ble da sekvensert og det ble vist at det ikke var blitt innført andre mutasjoner i genet under PCR.

Det neste som ble gjort var å uttrykke både den native og den muterte polymerasen. Det ble tatt uttak hver annen time og laget lysat ved hjelp av varmebehandling. Ved analyse i SDS-PAGE var det tydelig at ekspresjonen av den muterte polymerasen var mye bedre enn ekspresjonen av den native polymerasen. Den native polymerasen ble da uttrykt på nytt. Etter en del forsøk med ulike induseringstidspunkter og dyrkningstider ble det oppnådd en vellykket ekspresjon også av den native polymerasen.

Ved fluorescensbasert aktivitetsanalyse ble antall enheter i begge lysatene estimert til ca. 0.8 U/μl. Da det var noe lite lysat av den muterte polymerasen ble denne uttrykt en gang til. Cellene ble da høstet etter 6 timer. Aktiviteten i lysatet ble bestemt til 0.4 U/μl.

Når lysatene skulle renses var det første som ble forsøkt en hydrofob interaksjonskolonne. Dette ga ikke noe vellykket resultat.

Det neste som ble forsøkt var en anionbytter; HiPrep Q XL (Amersham Biosciences). Rensing med denne kolonnen ga et noe renere lysat, men utbyttet var ganske dårlig. Fraksjonene med høyest aktivitet ble overført til neste rensetrinn som var gelfiltrering på Sephacryl S-200 HR. Etter gelfiltrering ble fraksjonene med mest aktivitet undersøkt i SDS-PAGE. Det viste seg at det fortsatt var like mange bånd på gelen, og utbyttet var så lavt, at det ble besluttet å utføre de neste analysene på grovlysatet.

Dette lysatet ble først benyttet i sekvensering på Alfexpress™. Det ble da vist at den native og den muterte polymerasen fungerer under helt ulike betingelser. Den native trenger veldig høye konsentrasjoner av ddNTP for å fungere, mens den muterte ikke har behov for dette. Dette viser at mutasjonen har den forventede effekten.

Det ble også gjort sammenligninger mellom nativ *Tma* polymerase I og nativ *Taq* polymerase I. Disse sammenligningene viste at *Tma* polymerase ikke har bedre sekvenseringsegenskaper enn *Taq* polymerase, i hvert fall ikke i nativ form. *Tma* polymerase ga dårligere sekvenseringssignaler, i tillegg til at flere baser i sekvensen ikke stemte i forhold til den riktige sekvensen.

Etter noe optimalisering ble den muterte varianten prøvd ut i et annet sekvenseringssystem; MegaBACE, hvor det benyttes fluorescensmerkede ddNTP'er. Problemet med dette systemet var tilsynelatende tidlig terminering. Da dette kan komme av for høy ddNTP-konsentrasjon, ble konsentrasjonen av ddNTP ble gradvis redusert uten at dette ga bedre resultater. Ved nærmere ettersyn av sekvensene som ble oppnådd viste det seg at dette ikke var M13-sekvens. Dette viser at polymerasen ikke fungerte i dette systemet under de betingelsene som ble benyttet.

4.2 Mutagenese av *Tma* polymerase I

Mutagenesen ble gjennomført ved hjelp av QuikChange™ Site-Directed Mutagenesis Kit.

Fordelen med denne metoden er den krever lite DNA-templat og det er ikke nødvendig med et høyt antall sykluser for å oppnå høy mutasjonseffektivitet. Det at man i tillegg benytter en polymerase med høy fidelitet, bidrar til at det er mindre sjanser for tilfeldige mutasjoner under reaksjonen.

I denne metoden blir plasmider som inneholder mutasjon skilt fra parentale plasmider ved kutting med *DpnI*. Dette enzymet er en endonuklease med målsekvens 5'-Gm⁶ATC-3' og fordøyer metylert og hemi-metylert DNA.

Det er derfor viktig å passe på, ved bruk av dette kitet, at plasmid-DNA har blitt isolert fra en *dam*⁺ *E.coli* stamme. Det vil si at bakteriene metylerer sitt DNA. De fleste *E.coli* stammer, inkludert *E.coli* DH5α, har denne egenskapen. Enkelte stammer, som f. eks JM 110 mangler denne egenskapen og kan dermed ikke benyttes i denne metoden.

Da det var noe uklart om hvor store konsentrasjoner av plasmid som ville gi best resultat, ble mutagenesen utført på fire ulike konsentrasjoner av plasmidet, henholdsvis 5, 10, 20 og 50 ng. Etter mutagenese, påfølgende kutting med *DpnI* og transformering inn i XL 1 Blue superkompetente celler var det vekst i alle parallellene, men best vekst i A3 som inneholdt 20 ng plasmid i utgangspunktet. Det ble derfor jobbet videre med denne. 8 kolonier ble da dyrket opp, plasmid ble isolert og kuttet med *HpaI*, for å påvise mutasjonen. Kutting med dette enzymet i det muterte plasmidet ga to bånd, noe som viste at mutasjonen var innført i alle 8 parallellene. Mutasjonen ble også påvist ved sekvensering av hele genet i MegaBACE-systemet. Det ble da også vist at det ikke hadde blitt innført noen andre mutasjoner under PCR. Uønskede mutasjoner trenger ikke nødvendigvis å bety noe for aktiviteten til enzymet. Dette vil være avhengig av om mutasjonen som har blitt innført fører til at det ved translasjon blir satt inn en ny aminosyre eller ikke. Effekten av en mutasjon vil også avhenge av hvor i proteinet den blir innført. Hvis, for eksempel, en aminosyre i det aktive setet blir substituert med en annen aminosyre, kan dette få konsekvenser for aktiviteten til enzymet. Det er derfor viktig å forsikre seg om at slike mutasjoner ikke har blitt innført.

4.3 Ekspresjon og isolering av rekombinante proteiner

4.3.1 Ekspresjon av nativ og mutert *Tma* polymerase I

Etter vellykket mutagenese var neste trinn å uttrykke både den native og den muterte varianten av *Tma* polymerase I. Genet for polymerasen var allerede i utgangspunktet klonet inn i ekspresjonsvektoren pTrc99A. En ekspresjonsvektor er konstruert slik at den inneholder en regulerbar promoter. Denne promoteren kan induseres slik at den uttrykker det klonede genet i respons til små endringer i omgivelsene. pTrc99A-vektoren inneholder en sterk hybrid trp/lac promoter, translasjonsstart-sekvensen (ATG), lacZ ribosom bindingssete, multiple kloningssete fra pUC18 og rrnB transkripsjons-terminatorene.

Denne vektoren kan induseres ved å tilsette IPTG, en galaktoseanalog, i vekstmediet.

Som vertscelle ble det brukt både XL 1 Blue og DH5 α *E.coli*-celler. XL 1 Blue *E.coli*-celler fra kitet ble forsøkt først da plasmidet allerede var transformert inn i disse cellene etter mutagenesen. Disse cellene fungerte godt ved ekspresjon, men ved senere ekspresjoner ble det benyttet *E.coli* DH5 α celler, da disse var tilgjengelig på instituttet. Denne bakteriestammen har tidligere blitt brukt ved ekspresjon av DNA polymerase fra *Bacillus cerus* med gode resultater (Tveit, 2000).

Under ekspresjonen ble det gjort uttak annenhver time og laget lysat. Det er viktig å finne ut optimal induksjonstid for å oppnå best mulig utbytte. Ved for lang induksjonstid kan det oppstå proteolytisk degradering av de produserte enzymene.

Ved ekspresjon av den muterte varianten ble cellekulturen indusert ved en OD på 0.8 og topp ekspresjon ble observert etter 6 timer.

Ved den første ekspresjonen av den native polymerasen, ved samme betingelser som den muterte, ble ikke resultatet vellykket. Det ble derfor prøvd med ulike induksjonstidspunkt, og IPTG- mengden ble økt fra 125 mg/l til 150 mg/l. Det ble da oppnådd en vellykket ekspresjon når cellekulturen ble indusert ved en OD på 0.4 og en induksjonstid på 8 timer.

Det at disse to polymerasene ikke oppfører seg likt under ekspresjonen var noe uventet, i og med at det kun er en aminosyre som skiller de to polymerasene fra hverandre. Det ble benyttet like betingelser, som medium og temperatur, og samme mengde bakterier ble tilsatt i alle forsøkene.

Senere ekspresjoner av de to proteinene viste seg å bli noe mer problematiske. Etter en del forsøk uten aktivitet i grovlysatet, ble det ved SDS-PAGE vist at det var lyseringen som ikke var vellykket. Dette kunne lett sees på gelen etter SDS-PAGE da det nesten ikke var noen bånd i brønnene som inneholdt lysatet. Antakeligvis var det feil pH i resuspensjonsbufferen som gjorde lyseringen vanskelig. Da denne bufferen ble kalibrert til riktig pH ble det oppnådd lysering av cellene.

I tidligere forsøk utført av Gelfand *et al.* har det blitt observert at ved ekspresjon av *Tma* polymerase i *E.coli* har man i tillegg til polymerasen på 97 kDa, fått uttrykt en forkortet versjon av polymerasen på ca. 86 kDa. Genet har da blitt uttrykt fra posisjon 140, hvor det også sitter et kodon for metionin. På gelen etter SDS-PAGE etter ekspresjon av polymerasene i denne oppgaven kan man se at det finnes et bånd som ligger på ca. 86 kDa (se figur 3.13 og 3.15). Dette båndet blir også sterkere ettersom induksjonstiden økes, noe som kan tyde på at dette båndet tilsvarer den forkortede polymerasen som har blitt observert tidligere (Gelfand *et al.*, 1995). Hvis denne informasjonen hadde blitt oppdaget tidligere kunne dette blitt analysert ved hjelp av zymografi. Dette er en teknikk hvor man støper aktivert DNA inn i polyakrylamidgelen før man utfører SDS-PAGE. Etter at elektroforesen er kjørt ferdig, vasker man ut SDS. Proteinene vil da kunne renaturere og under rette betingelser vil polymerasene da replikere DNA som finnes i gelen. En av nukleotidene som tilsettes er merket og bånd som inneholder DNA polymerase farges da spesifikt. Man ville da sett om det aktuelle båndet på gelen inneholdt DNA polymerase, eller om dette var et annet protein.

4.3.2 Tillaging av grovlysat

For å isolere de rekombinante proteinene er det nødvendig å lysere cellene. Dette blir gjort ved hjelp av lysozym og detergenter. Når bakteriecellene lyseres vil det også frigjøres proteolytiske enzymer og det vil bli dannet et surere miljø. For å redusere eventuell skade dette kan påføre proteinet blir det tilsatt en buffer med en passende pH (pH 8) før lyseringen. Denne inneholder også EDTA som vil hemme katalytisk

oksidering av proteinene, og D-glukose som skal føre til stabilisering av lysosomale membraner og dermed senke frigjørelsen av proteaser.

I lysis-buffen som blant annet inneholder detergenter og som tilsettes før varmebehandling av lysatet, er det, i tillegg til EDTA, tilsatt proteasehemmeren PMSF og den reduserende agenten DTT.

Varmebehandlingen fjerner store mengder uønskede proteiner, bl.a. de endogene proteinene fra vertsbakterien, og egner seg veldig godt til isolering av varmostabile enzymer, som kan utsettes for høye temperaturer uten å miste aktiviteten.

Det ble deretter forsøkt felling med ammoniumsulfat for å oppkonsentrere lysatet. Dette førte til tap av aktivitet, og dermed kuttet ut som et trinn i renseprosessen. I senere analyser, i forbindelse med rensingen på en hydrofob interaksjonskolonne, ble det oppdaget at *Tma* polymerase I ikke tåler så høye konsentrasjoner av ammoniumsulfat.

Etter tillaging av grovlysaten ble disse analysert ved hjelp av SDS-PAGE. På gelen kunne man se bånd som tilsvarte polymerasen, men det var vanskelig å se hvilket bånd som var sterkest. Det ble derfor benyttet aktivitetsanalyse for å bestemme hvilket uttak som inneholdt mest enzym.

Aktivitetsanalysen er diskutert under punkt 4.5

Et problem som oppstod i forbindelse med grovlysaten, var tap av aktivitet etter oppbevaring i fryser. Etter at noe av lysatene hadde stått ved -20°C i opp i mot ett år, ble aktiviteten målt før disse skulle renses videre. Det viste seg da at aktiviteten hadde blitt kraftig redusert. Dette var uventet fordi lysatene var lagret med lagringsbuffer som bl.a. inneholder 50 % glyserol og PMSF, noe som skulle bidra til at enzymaktiviteten bevares og at det ikke brytes ned av proteaser. Noe av grunnen til tap av aktivitet kan være at lysatene hadde vært tint opp noen ganger for å ta ut prøver. Gjentatte opptining og nedfrysninger kan føre til tap av aktivitet i og med at enzymer er sårbare for slike temperaturforandringer. DNA hadde også blitt felt ut med 5 % streptomycinsulfat. Studier av DNA polymeraser fra *Thermotoga*-arter har tidligere vist at enzymet blir mer ustabil etter at DNA er fjernet fra løsningen. Det hadde derfor muligens vært en fordel og vente med å felle ut DNA til rett før lysatene skulle renses videre.

4.4 Rensing av lysatene

Rekombinante proteiner kan uttrykkes som fusjonsproteiner for å lette rensingen. Glutathione S-transferase (GST) og 6 (eller 11) histidiner er eksempler på hva som kan fusjonere med rekombinante proteiner under ekspresjon. Når disse rekombinante proteinene skal renses, skjer det i ett trinn der fusjonsproteinets særegne affinitet utnyttes, og en renhet på opp til 97 % kan oppnås (The Recombinant Protein Handbook Amersham Pharmacia Biotech 2000).

Hvis det uttrykte proteinet derimot ikke er et fusjonsprotein, må flere rensetrinn til for å oppnå høy renhet. De forskjellige formene for kromatografiske teknikker som blir benyttet ved rensing av rekombinante proteiner er beskrevet i tabell 4.1

Teknikker og separasjonsmetoder til bruk ved rensing av rekombinante proteiner.	
Kromatografiske teknikker	Separasjonsmetode
Ionebytter	Ladning
Affinitet	Biologisk affinitet
Hydrofobiske interaksjoner	Overflate-hydrofobisitet
Gelfiltrering	Molekylær størrelse
Revers-fase	Hydrofobe interaksjoner

Tabell 4.1: Teknikker og separasjonsmetoder til bruk ved rensing av rekombinante proteiner.

I denne oppgaven ble det forsøkt rensing med hydrofob interaksjonskromatografi, ionebytterkromatografi og gelfiltrering.

4.4.1 Fjerning av DNA

Det er viktig å få fjernet mest mulig DNA før videre rensing på kolonner, fordi rester av DNA i prøven kan forstyrre binding av proteinene til kolonnematerialet i ulike kromatografimetoder.

For å fjerne DNA i lysatet ble det benyttet 5 % streptomycinsulfat. En slik behandling kan også føre til at noen proteiner også felles ut. Det ble derfor sjekket aktivitet før og etter felling med streptomycinsulfat. Det viste seg at aktiviteten sank noe etter fellingen. Samtidig ble det observert at proteinmengden i lysatet sank betraktelig, fra 1.2 mg/ml til henholdsvis 0.6 og 0.7 mg/ml, noe som bidrar i renseprosessen.

4.4.2 Hydrofob interaksjonskromatografi

I denne metoden skilles proteiner fra hverandre ved at de har ulik hydrofobisitet på overflaten, og dermed reagerer ulikt med det hydrofobe kolonnematerialet under polare betingelser. Man da benytter da en startbuffer med høy saltkonsentrasjon, i dette tilfellet 0.05 M Natriumfosfatbuffer pH 7 med 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, og eluerer proteinene med en buffer med lav saltkonsentrasjon. Kolonnen som ble benyttet var HiPrep® 16/10 PHENYL (LOW SUB) fra Amersham Biosciences.

Under eluering av kolonnen ble det blant annet målt absorpsjon ved 280 nm, som er en bølgelengde hvor alle proteiner absorberer. Som man kan se på figur 3.11 viste kromatogrammet, som fremstilte absorbans ved 280 nm mot elueringsvolum, bare en stor topp som lå i området før elueringen startet. Dette tyder på at en stor mengde proteiner gikk rett i gjennom kolonnen uten å binde seg til kolonnematerialet. Hvis proteinet av interesse da hadde bundet, kunne dette vært en effektiv måte å rense proteinet på. Selv om det ikke var noen flere tydelige topper i kromatogrammet ble aktiviteten sjekket i en del fraksjoner med jevne mellomrom, i tilfelle ikke konsentrasjonen var høy nok til å gjøre et tydelig utslag i kromatogrammet. Det ble da utført dråpedialyse på fraksjonene som skulle testes fordi polymerasen sannsynligvis ikke fungerer ved så høye saltkonsentrasjoner som var i fraksjonene. Det ble også sjekket aktivitet i den fraksjonen som gikk rett igjennom kolonnen. Det ble da målt en viss aktivitet i den fraksjonen som gikk rett igjennom og noe aktivitet i noen av de siste fraksjonene. Til sammen utgjorde dette ca. 6.9 % av aktiviteten som fantes i lysatet ved applisering på kolonnen. Dette er i og for seg ikke vært et dårlig resultat dersom aktiviteten hadde vært samlet i en eller flere mindre fraksjoner. Men i

og med at mesteparten av aktiviteten befant seg i U-fraksjonen som var på 60 ml og som antakeligvis er den mest urene fraksjonen, ble ikke resultatet regnet som noe å gå videre med. Resultatene tyder på at noe av proteinet gikk rett igjennom kolonnen, men at noe bandt sterkt til kolonnematerialet og ble ikke eluert før saltkonsentrasjonen var veldig lav. Det at aktiviteten var så lav, selv etter flere omganger med dialyse, tyder på at enzymet ikke tålte å bli utsatt for så høy konsentrasjon av ammoniumsulfat, men at det mistet mye av sin aktivitet. Dette ble også vist ved å innkubere enzymet i ulike konsentrasjoner av ulike salter over natt etterfulgt av dialyse og test av aktivitet. Resultatene viste at enzymaktiviteten ble betraktelig redusert når enzymet ble utsatt for så høye saltkonsentrasjoner.

I og med at store mengder av enzymet antakeligvis har blitt inaktivert på grunn av den høye saltkonsentrasjonen, er det vanskelig å si om mesteparten av proteinet gikk rett i gjennom kolonnen eller om mesteparten av proteinet bandt sterkt til kolonnen og ble eluert ut sist. Det er tidligere vist at hydrofob interaksjonskromatografi med en konsentrasjon på 0.3 M ammoniumsulfat har vært vellykket i rensing av *Tma* polymerase (Gelfand, *et al.*, U.S. patentskrift, 1995). Da dette ikke var kjent på det aktuelle tidspunktet ble ikke dette forsøkt.

Det ble derfor besluttet å prøve ionebytterkromatografi som første trinn i rensingen.

4.4.3 Ionebytterkromatografi

Ionebytterkromatografi er en kromatografimetode som separerer proteiner med hensyn på ladning. Prinsippet er at ladete proteiner vil interagerer med ladete grupper som er koblet til kolonnematerialet. I dette tilfellet ble det benyttet en ferdigpakket kolonne fra Amersham Biosciences; HiPrep 16/10 Q XL. Dette er en sterk anionbytter. Det vil si at negative ladninger på proteinet vil interagere med funksjonelle grupper med positiv ladning som er koblet til kolonnematerialet. I denne kolonnen blir det benyttet en kvartenær aminogruppe som ligand; $-O-CH_2CHOHCH_2N^+(CH_3)_3$. Denne er koblet til matriksen via en kjemisk stabil eterbinding.

Ved bruk av en anionbytter er det viktig å bruke en startbuffer som har en pH som ligger over det isoelektriske punktet til proteinet som skal renses, slik at proteinet er negativt ladet. I dette tilfellet ble det benyttet 0.05 M Tris-HCl, pH 8, som startbuffer. pH 8 bør ligge godt over det isoelektriske punktet til polymerasen.

Som elueringsbuffer ble det benyttet 0.05 M Tris-HCl pH 8 med 1 M NaCl. Denne ble tilsatt i stigende konsentrasjon under elueringen slik at det dannes en saltgradient. Fordelen med å bruke en gradient i elueringen, i forhold til trinnvis økning av saltkonsentrasjonen, er at man får en bedre separasjon av proteinene som elueres ettersom hvor sterkt de binder til kolonnematerialet.

Etter felling med streptomycinsulfat var det henholdsvis 0.6 mg/ml og 0.7 mg/ml protein i lysatene med mutert og nativ polymerase. Etter ionebytterkromatografi var dette sunket til 0.5 mg/ml. Samtidig hadde aktiviteten blitt redusert ganske mye, med henholdsvis 83 % og 79.6 % for den muterte og den native polymerasen. Det kan derfor ikke sies at rensetrinnet var veldig vellykket. Ved å se på gelen som ble kjørt i SDS-PAGE kan man også se at det fortsatt er mange proteinbånd i lysatene. Dette kan muligens skyldes at det har blitt dannet aggregater av proteinene i lysatene, noe som vil føre til at de elueres samtidig. Lysatene har allikevel blitt en del renere. Dette kan sees på kromatogrammet fra elueringen. Man ser da ut i fra toppene i kromatogrammet at en del proteiner gikk rett i gjennom kolonnen og at en del proteiner ble eluert senere enn polymerasen.

En annen mulighet som kan forklare den lave aktivitet etter eluering er at proteinet ikke kan fungere i elueringsbufferen. Det ble vist at dette ikke er tilfellet ved at fraksjonene ble dialysert før aktivitetsmåling. Den lave utbyttet kan også ha noe med å gjøre at proteinet blir noe mer ustabilt og sårbart for nedbryting etter at DNA i lysatet har blitt fjernet (Simpson *et al.*, 1990).

4.4.4 Gelfiltrering

På gelbildene etter ionebytterkromatografi var det tydelig at det var proteiner med mange ulike størrelser i lysatet. På gelen så det ut som om mange av proteinene i lysatene var relativt små, og lå et stykke fra båndet som tilsvarte polymerasen. Det var derfor forventet at gelfiltrering ville være et effektivt rensetrinn i denne sammenhengen.

Resultatene var ikke som forventet. Etter aktivitetsmåling av de aktuelle fraksjonene, ble de fraksjonene med mest aktivitet analysert ved SDS-PAGE. Ved fremkalling av denne gelen ble det klart at rensetrinnene ikke hadde vært vellykket, da det fortsatt var mange bånd med veldig ulik størrelse på gelen. Det at disse proteinene hadde så ulik størrelse at de helt klart burde ha blitt separert under gelfiltreringen, forsterket mistanken om at det hadde blitt dannet proteinaggregater i lysatene. Aktiviteten hadde også sunket kraftig. Den gjenværende aktiviteten var på 0.88% for den muterte polymerasen og på 0.44 % for den native polymerasen, i forhold til grovlysate. Hvis man hadde oppnådd en tilfredsstillende rensing av fraksjonen, kunne et så lavt utbytte vært akseptabelt. Men når fraksjonen fortsatt var så uren som den var i dette tilfellet, var det ikke aktuelt å benytte denne i videre analyser.

4.5 Aktivitetsassay

Aktivitetsassayet som ble benyttet i oppgaven, var et fluorescensbasert assay hvor mengde DNA syntetisert ble målt ved å tilsette et fargestoff, PicoGreen®, som fluoriserer ved binding til dsDNA. Det har tidligere blitt vist at dette aktivitetsassayet er minst like nøyaktig som det radioaktivitetsbasert aktivitetsassayet som har blitt benyttet tidligere (Tveit *et al.*, 2001).

Aktivitetsassayet ble benyttet ved analyse av grovlysate og ved analyse av alle trinn i renseprosessen. For å gjøre diskusjonen mer oversiktlig diskuteres alle disse målingene under dette punktet, og ikke under hvert enkelt rensepunkt.

De første analysene som ble gjort ved denne metoden ble utført for å finne ut hvilket lysat som inneholdt mest av polymerasen, da dette var vanskelig å se ut i fra proteingelen. Det ble da tilsatt like mye enzym fra hvert lysat til reaksjonsblandingen, som inneholdt 10x polymerasebuffer, primet M13 og dNTP-miks.

Før tilsetning ble enzymløsningen fortynnet slik at det ble tilsatt 10 µl, og ikke 1 µl. Dette vil føre til at feilen ikke blir så stor hvis pipetteringen er litt unøyaktig eller hvis noe enzymløsning blir hengende igjen på pipettespissen. Reaksjonen ble kjørt ved 75°C, da det tidligere er vist at *Tma* polymerase I har et temperaturoptimum på mellom 75 og 80°C. Reaksjonen sto ved 75 °C i 3 minutter før reaksjonen ble stoppet med EDTA og satt på is. Det ble her antatt at 3 min lå i det lineære området til polymerasen, og siden analysene kun skulle brukes til å finne maks ekspresjon, var det viktigst at alle prøvene hadde like betingelser.

Når det var bestemt ved hvilke induksjonstider man fikk høyest ekspresjon, ble disse lysatene benyttet til videre analyser.

Det neste som ble gjort var å lage en tidskurve for å finne det lineære området for polymerasene. Det ble da gjort målinger mellom 1 og 20 minutter, og resultatene ble plottet i et diagram med absorbans mot tid. Det ble da observert at det lineære området gikk opp til en INT på ca. 300. Med grovlysatet ble det observert at ved en reaksjonstid på 3 minutter lå den målte verdien innenfor det lineære området. I videre analyser ble det derfor benyttet en reaksjonstid på 3 minutter. Det ble regnet som sannsynlig at fraksjoner i renseprosessen ikke ville ha en mye høyere konsentrasjon av polymerasen, da man i en renseprosess må regne med at en del aktivitet vil gå tapt. Det viste seg, ved aktivitetsmåling etter begge rensetrinnene, at ved en reaksjonstid på 3 minutter lå de målte verdiene innenfor det lineære området.

I renseprosessen ble aktivitetsanalysen benyttet for å analysere fraksjonene som lå under topper i kromatogrammet, for å finne ut om dette var polymerasen eller andre proteiner. Assayet ble også brukt til å finne ut hvilke fraksjoner som burde tas med videre til neste rensetrinn. I tidlige rensetrinn kan det være en fordel å måle aktivitet også i fraksjoner som ligger utenfor topper i kromatogrammet. Dette er fordi i tidlige rensetrinn, finnes det veldig mye proteiner i lysatet. Det er da ikke sikkert at fraksjonen som eventuelt inneholder polymerasen vil gi et stort utslag ved 280 nm. I dette tilfellet var ikke dette noe stort problem, da aktiviteten var relativt høy i fraksjonene som lå innenfor toppen i kromatogrammet. Hvis det ikke hadde blitt observert aktivitet i disse fraksjonene, ville det vært naturlig å måle aktivitet i fraksjoner som lå utenfor disse toppene.

Problemet med dette aktivitetsassayet var noe ujevne resultater. Dette kan komme av unøyaktig pipettering, da veldig små konsentrasjonsforskjeller kan føre til relativt store forskjeller i resultatene. Det ble gjort forsøk på å minimalisere slike pipetteringsfeil. Som nevnt ble polymerasen fortynnet før tilsetning slik at man tilsatt 10 µl i stedet for 1 µl. I tillegg ble det laget en stor "batch" med reaksjonsblanding, som så ble fordelt i eppendorfrør. Men selv om man tar slike forbehold, er det vanskelig å få nøyaktig samme konsentrasjon i alle prøvene, og resultatene vil derfor bli noe ujevne. Det ble derfor målt minst tre paralleller av hver prøve, med unntak av aktivitetsmålinger etter rensing, slik at middelverdien kunne benyttes i videre beregninger.

Det ble også benyttet en 0-prøve som inneholdt alle løsningene, men som ble tilsatt EDTA umiddelbart og som ikke ble innkubert ved 75°C. Grunnen til dette er at det kan finnes ssDNA og dsDNA i prøvene, selv om disse er felt med streptomycinsulfat. DsDNA som finnes i prøven før polymerasereaksjonen vil da også binde til seg PicoGreen®, noe som vil føre til feil i målingene. Store mengder ssDNA kan også gi utslag i assayet. Det er derfor viktig å benytte en slik 0-prøve slik at man oppnår mest mulig nøyaktige resultater.

I de siste aktivitetsanalysene, etter ny ekspresjon av proteinene, var resultatene mer ujevne og veldig lave. Da det hadde blitt benyttet et annet rør med M13, ble det mistenkt at dette muligens var dobbelttrådig M13. Dette ble motbevist ved å kutte noe av M13 med *EcoRI*. Restriksjonsenzymer kutter bare i dsDNA og siden prøven med M13 kun hadde ett bånd på agarosegelen etter kutting, viste dette at M13 som ble benyttet var enkelttrådig. En annen mulighet var at polymerase-bufferen, som også var blitt laget ny, hadde en feil sammensetning. Det ble derfor laget en ny 10x polymerase buffer, og dette ga bedre resultater, selv om resultatene fortsatt var ganske lave. Tidspress gjorde at det ikke ble gjort videre undersøkelser med aktivitetsassayet.

4.6 Sekvensering med nativ og mutert *Tma* polymerase

Etter at mutasjonen hadde blitt innført og de to polymerasene uttrykt og isolert, var neste trinn og teste disse to polymerasene i syklisk sekvensering. Det er i denne metoden en stor fordel med en varmestabil polymerase, fordi man da ikke trenger å tilsette en ny polymerase etter hvert denatureringstrinn. Problemet med en del av de varmestabile polymerasene har vært at de diskriminerer mot inkorporering av ddNTP. Man må derfor i termineringsløsningen ha en høy konsentrasjon av ddNTP i forhold til dNTP, for at polymerasen skal inkorporere disse. Problemet med en slik diskriminering er at sekvensmønstrene ved bruk av disse enzymene ofte blir ujevne. Det vil si at toppene i signalkurvene varierer mye i størrelse, slik at automatisert sekvensbestemmelse blir vanskelig. Dette var problemet med *Taq* polymerase, men ble løst ved substitusjon av Phe667 til tyrosin (Horn *et al.*, 1997). Målet med denne oppgaven var å se om denne mutasjonen hadde samme gunstige effekt i *Tma* polymerase, som også viser diskriminering mot ddNTP.

4.6.1 Bekreftelse av mutasjonen

Det første som a ble gjort var å teste den native og den muterte polymerasen på Alfexpress™. De to polymerasene ble da benyttet med termineringsløsninger som var tilpasset sine egenskaper. Det vil si at den native polymerasen hadde en mye høyere konsentrasjon av ddNTP enn den muterte varianten. Det ble ved tillaging av disse løsningene tatt utgangspunkt i termineringsløsninger tilpasset nativ og mutert *Taq* polymerase I, som har lignende egenskaper som *Tma* polymerase I. Ved bruk av disse tilpassede termineringsløsningene ble det oppnådd sekvenser med begge enzymene. Hvis termineringsløsningene ikke hadde blitt tilpasset enzymets egenskaper ville det antageligvis ikke kunne fungere. Dette ble vist ved å bruke de to polymerasene med termineringsløsninger som var tilpasset den andre polymerasen. Som forventet ble det ikke oppnådd noen sekvens i noen av tilfellene. Når den muterte polymerasen blir benyttet under reaksjonsbetingelser som er tilpasset den native varianten, vil alle fragmentene bli terminert veldig tidlig på grunn av den høye konsentrasjon av dideoksynukleotider. Det motsatte vil skje når den native polymerasen benyttes under betingelser tilpasset den muterte polymerasen. Det vil da være veldig få fragmenter som blir terminert fordi konsentrasjonen av ddNTP er såpass lav og polymerasen diskriminerer mot inkorporering av disse nukleotidene. Disse to forsøkene viser at substitusjon av fenylalanin i posisjon 730 til tyrosin fører til mindre diskriminering mot ddNTP, slik som beskrevet i tidligere forsøk på *Taq* og *E.coli* polymerase I (Astatke *et al.*, 1998, Horn *et al.*, 1997).

4.6.2 Optimalisering

Videre ble forsøkene på Alfexpress™ brukt til å optimalisere reaksjonsbetingelsene for *Tma* polymerase. For den native varianten måtte konsentrasjonen av ddATP, ddCTP og ddGTP økes ytterligere i forhold til *Taq* polymerase. Det samme var tilfellet for alle de fire ddNTP for den muterte varianten. Disse ble doblet i forhold til *Taq* polymerase. Da det var mest interessant å se hvordan *Tma*F730Y fungerte med fluorescensmerkede ddNTP i MegaBACE-systemet, og siden betingelsene på dette systemet antakeligvis ville være noe annerledes, ble det besluttet å fortsette optimaliseringen i dette systemet i stedet for på Alfexpress™.

4.6.3 Sammenligning av nativ *Tma* og *Taq* polymerase

Det ble deretter jobbet videre med den native varianten på Alfexpress™. Da det så ut som om denne polymerasen ga ganske fine sekvenssignaler, var det interessant å sammenligne denne med den native varianten av *Taq* polymerase. Sekvenseringen ble i første omgang utført på et enkelttrådig M13-templat. Dette er et veldig enkelt templat uten særlig komplisert sekvens. Det viste seg i disse forsøkene at *Tma* polymerasen hadde de samme problemene som *Taq* polymerase, og i enda større grad. Sekvenssignalene etter bruk av *Tma* polymerase hadde enda mer ujevne toppler enn etter bruk av *Taq* polymerase. I tillegg var flere av basene tolket ulikt i de to reaksjonene. Da dette ble sammenlignet med den kjente sekvensen av M13mp18, var det i reaksjonen med *Taq* at det var blitt tolket riktig base. Dette tyder på at *Tma* polymerase ikke er et bedre sekvenseringsenzym enn *Taq* polymerase.

De to polymerasene ble også sammenlignet ved sekvensering av et noe mer komplisert templat. Det ble da benyttet vektoren pGEM. Også her var det tydelig at sekvensene med nativ *Taq* polymerase var mye bedre enn de som ble oppnådd med den native *Tma* polymerasen.

Det har også i andre undersøkelser blitt vist at den kommersielle varianten av *Tma* polymerase I, også kalt *ULTma*, ikke har spesielt høy fidelitet. Den kommer bl.a. dårligere ut enn *Taq* og *Pfu* polymerase i PCR-reaksjoner (Cline *et al.*, 1996, Diaz *et al.*, 1998). Det ble ikke utført tester av *Tma* polymerase i PCR i denne oppgaven.

I og med at betingelsene for *Tma* polymerase ble optimalisert før de to polymerasene ble sammenlignet, skulle ikke reaksjonsbetingelsene kunne føre til at *Tma* polymerase ga dårligere resultater. Lysatene som ble benyttet var også omtrent like rene, da den native varianten av *Taq* polymerase som ble benyttet kun var rensset ved felling med ammoniumsulfat.

Man kan derfor, ut i fra de resultatene som ble oppnådd, konkludere med at *Tma* polymerase i nativ form ikke er et bedre sekvenseringsenzym enn nativ *Taq* polymerase.

4.6.4 Sammenligning av *Tma* polymerase FY og Thermosequenase

Selv om resultatene med den native polymerasen ikke var spesielt gode, ble den muterte varianten allikevel prøvd ut i MegaBACE-systemet. I dette systemet blir det benyttet ddNTP som er fluorescensmerket. Det var derfor forventet at det var nødvendig med høyere konsentrasjon av disse merkede nukleotidene enn de vanlige umerkede dideoksynukleotidene, fordi polymerasen antageligvis vil ha større problemer med å inkorporere nukleotider hvor det er koblet på store fluoriserende grupper. Mengden ddNTP ble derfor doblet i forhold til mengden som ble brukt på Alfexpress™. Resultatene fra denne første sekvenseringen viste at signalene bare gikk et lite stykke ut i sekvensen. Signalene i starten av den tolkede sekvensen var veldig sterke. Dette kunne tyde på at konsentrasjonen av ddNTP var for høy. En stor del av fragmentene ville da bli terminert veldig tidlig, noe som ville resultere i sterke signaler i begynnelsen av sekvensen. Det ble derfor forsøkt å doble dNTP-konsentrasjonen. Dette tilsvarer halvering av ddNTP-konsentrasjonen, da det er konsentrasjonsforholdet mellom dNTP og ddNTP som har betydning i sekvensreaksjonen. Etter denne økningen i dNTP-konsentrasjon, ble det fortsatt observert tidlig terminering og sterke signaler i begynnelsen av sekvensen. Det ble også utført en sekvensering av samme M13-templat med det kommersielle kitet. Sekvenssignalene i denne reaksjonen gikk lenger ut i sekvensen og var ikke like

sterke som signalene i reaksjonene med *Tma* polymerase. Dette utelukket at det var noe galt med templatet som ble benyttet. Resultatene tydet på at ddNTP-konsentrasjonen fortsatt var for høy i reaksjonen med *Tma* polymerase. Dette var uventede resultater og det ble da stilt spørsmål om konsentrasjonene som var oppgitt på stockløsningene med ddNTP var korrekte, eller om disse i realiteten var høyere enn oppgitt. Det ble derfor laget en fortynningsserie, hvor ddNTP-konsentrasjonen ble gradvis redusert. Det ble da laget 5 ulike fortynninger, hvor ddNTP-konsentrasjonen gikk fra 0.2 μ M og helt ned til 3 nM ut i fra de oppgitte konsentrasjonene. Disse konsentrasjonene ligger langt under den konsentrasjonen som var forventet å være optimal. Denne fortynningsserien kunne gi svar på om det var ddNTP-konsentrasjonen som var problemet i reaksjonen. Dette viste seg å ikke være tilfellet. Sekvensresultatene ble ikke bra i noen av fortynningene.

I alle reaksjonene hadde MegaBACE systemet tolket sekvens. Disse var fra ca. 30 baser til ca. 400. Disse sekvensene ble så sammenstilt med M13-sekvensen i Blast. Det viste seg da at ingen av de tolkede sekvensene hadde likhet med M13-sekvensen, bortsett fra den som var utført med det kommersielle kitet. Sekvensene som hadde blitt tolket har da bare blitt tolket ut i fra bakgrunn i reaksjonen, noe som er et vanlig problem ved bruk av sekvenssoftware.

Ut i fra disse resultatene ble det konkludert med at forsøkene med å få *Tma* F730Y polymerasen til å fungere i MegaBACE systemet ikke var vellykket.

Hovedgrunnen til dette var at opplysninger om komponenter som brukes i det kommersielle kitet ikke var tilgjengelig fra produsenten. MegaBACE systemet er et veldig følsomt system. Komponenter som f.eks. detergenter benyttes ofte for å bedre sekvensreaksjoner. Innholdet i reaksjonsbufferer som benyttes, som saltkonsentrasjon og pH, vil også ha innflytelse på reaksjonen. Uten denne informasjonen var det en vanskelig oppgave å optimalisere betingelsene for *Tma* polymerase I.

En annen faktor som kan ha betydning er renhetsgraden til enzymene som benyttes. Enzymløsningen med *Tma* polymerase var som sagt ikke rensset, slik at det finnes mange andre proteiner og urenheter i løsningen, noe som kan forstyrre i sekvensreaksjonen i et så følsomt system som MegaBACE. Enzymet som benyttes i det kommersielle kitet har antakeligvis ikke dette problemet.

I og med at det ikke ble oppnådd noen brukbare resultater ved sekvensering i MegaBACE-systemet, fantes det heller intet grunnlag for å sammenligne *Tma* polymerase med det kommersielle kitet.

4.7 Videre arbeid

I videre arbeid med denne polymerasen ville det vært naturlig å rense enzymet på nytt. Dette vil kunne gjøres på en enklere måte hvis proteinet blir uttrykt med såkalte Histidin-tags. Rensingen kan da skje i et effektivt trinn ved hjelp av en affinitetskolonne. En slik prosedyre ville være tidsbesparende og antakeligvis gi et bedre utbytte enn det som oppnås ved tradisjonelle rensemetoder, hvor flere trinn er nødvendig for å få et rent produkt (Gaberc-Porekar *et al.*, 2001).

Det ville også vært interessant med videre forsøk i MegaBACE-systemet med et renere enzympreparat, og etter mer optimalisering av betingelsene. Målet vil da være å få sammenlignet *Tma* F730Y polymerase med det kommersielle kitet som benyttes. Dette vil da forutsette at mer informasjon om reaksjonsbetingelsene som benyttes i MegaBACE-systemet er tilgjengelig.

Andre mutasjoner som det da kan være aktuelt å innføre i *Tma* polymerase er å lage en Klenow-variant. Det vil si at det N-terminale 5'-3'eksonukleasedomenet fjernes, da enzymer uten denne aktiviteten ofte fungerer bedre som sekvenseringsenzymer. Fjerning av dette området fører i *Taq* polymerase I også til økt termostabilitet (Hamilton *et al.*, 2001), noe som også er vist i *Tma* polymerase I (Gelfand, *et al.*, U.S. patentskrift 5420029, 1995).

Det er også beskrevet mutasjoner av *Taq* polymerase I som gjør enzymet bedre i stand til å inkorporere fluorescensmerkede deoksy- og dideoksynukleotider. Dette ville også være interessant å innføre i *Tma* polymerase I (Richards *et al.*, 1998).

I denne oppgaven ble det ikke tid til å teste enzymet i PCR-reaksjoner. Dette har i midlertidig blitt gjort med den kommersielle varianten, *ULTma* polymerase. I disse undersøkelsene viste det seg at dette enzymet ikke hadde spesielt høy fidelitet, på tross av korrekturlesningsaktiviteten (Cline *et al.*, 1996, Diaz *et al.*, 1998).

Undersøkelser av eksonukleaseaktivitetene til polymerasen er også forsøk det ville vært aktuelt å gjennomføre.

5.0 Materialer

Denne delen av oppgaven beskriver alle de materialer og apparater som har blitt benyttet i oppgaven. For oversiktens skyld er nummereringen i samsvar med kapitlene i metodedelen. Under punkt 5.9 finnes beskrivelse av generelle løsninger og buffere, som har blitt benyttet i flere av metodene.

5.1 Arbeid med mikroorgansimer

Vekstmediene ble sterilisert ved autoklaving og oppbevart ved 4°C. I de tilfellene vekstmediene ble tilsatt antibiotika ble dette gjort etter autoklavingen, og først når løsningen hadde kommet ned i en temperatur på under 50°C. Hvis temperaturen er høyere enn 50°C kan antibiotikaen bli ødelagt.

LB-medium:	10 g Trypton, 5 g gjærekstrakt, 10 g NaCl og 950 ml MQ-vann. PH justeres til 7.0 med 5 M NaOH. Volumet justeres til 1 l med MQ-vann. Autoklaveres.
LB-medium til skål:	LB-medium tilsettes 1.5 % Bacto-agar. Autoklaveres.
NZY⁺-medium:	500 ml dH ₂ O, 5 g NZ-amine, 2.5 g gjærekstrakt, 2.5 g NaCl. pH justeres til 7.5 og løsningen autoklaveres.

5.2 Arbeid med DNA

5.2.1 isolering av plasmid

5.2.1.1 Kvikk-sjekk metoden

Fenol:kloroform (1:1):	Fenol og klorform blandes i forhold 1:1. Blandingen ekstraheres flere ganger med 0.1 M Tris-HCl, pH 7.6. Oppbevares under likt volum av 0.01 M Tris-HCl, pH 7.6 i mørke flasker ved 4°C.
-------------------------------	--

5.2.1.2 Plasmidisolering med GFX™ Micro Plasmid Prep Kit:

Oppskriftene på bufferne er hentet fra manualen som fulgte med kittet. Alle løsningene fulgte med kittet.

Løsning I:	100 mM Tris-HCl, pH 7.5, 10 mM EDTA, 400µg/ml RNase A
Løsning II:	1 M NaOH, 5.3 % SDS. Fortynnes med 26 ml destillert vann før bruk.
Løsning III:	Bufferløsning med acetat og kaotrope ioner

Vaskebuffer: Tris-EDTA-buffer. Tilsettes absolutt etanol til 80 % før bruk

5.2.2 Agarose-gelelektroforese av DNA

50 x TAE-buffer: 242g Tris-base, 57.1ml iseddik, 100ml 0.5M EDTA pH 8.0, MilliQ-vann til en liter

Etidiumbromid (10mg/ml): Levert fra Quantum Appligene, Ref.nr. ETBC1001

6 x agarossegel prøvebuffer: Levert fra Fermentas, produktnr. #R0611

λ-DNA markør: λ-DNA som er kuttet med restriksjonsenzymene *EcoRI* og *HindIII*. Levert fra Fermentas, produktnr. #SMO191.

5.3 Analyse av DNA-sekvens

5.3.1 Løsninger til bruk for nukleotidsekvensering på ALFexpress™

Oppskriftene på løsningene er hentet fra ALFexpress DNA Sequencer User Manual, Pharmacia Biotech, 56-1173-21, utgave AA og AC.

Long Ranger gelløsning: 50 % stock-løsning fra FMC BioProducts, Prod. nr. 50615.

40 % akryl/bisakrylamid gelløsning (19:1): Ferdigblanding fra Saveen Biotech, Prod. nr. S013523-500

10 % APS: 1 g ammoniumpersulfat (APS) løses i MilliQ-vann til 10 ml. Lagres i 0.5 ml alikvoter ved -20°C.

10x TBE-buffer: 108 g Tris-base, 55 g Borsyre, 4 ml 0.5 M EDTA pH 8.0 og tilsett MilliQ-vann til 1 liter. Løsningen filtreres gjennom et 0.45 µm vakum-filter.

Bind-Silane bruker-løsn.: 7.5 ml Bind-Silane (stock-løsn.), 2.0 ml etanol, 0.5 ml 10 % (v/v) eddiksyre.

Stoppløsning: Deionisert formamid tilsatt 5 mg/ml Blue Dextran 2000.

5.3.2 Termineringsløsninger tilpasset *Taq* DNA polymerase FS

Termineringsløsningene er tatt fra sekvenseringsprotokoll tillaget for sekvensering med *Taq* DNA polymerase FS (T. Kristensen 1997 i samarbeid med Hartmut Voss).

- A-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 1 mM av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og 5 μ M ddATP
- C-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 1 mM av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og 5 μ M ddCTP.
- G-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 1 mM av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og 5 μ M ddGTP.
- T-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 1 mM av dATP, dCTP, dTTP og dGTP og 5 μ M ddTTP.

5.3.3 Termineringsløsninger tilpasset *Tma* polymerase FY

- A-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 1mM av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 10 μ M ddATP
- C-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 1mM av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 10 μ M ddCTP
- G-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 1mM av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 10 μ M ddGTP
- T-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 1mM av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 10 μ M ddTTP

5.3.4 Termineringsløsninger tilpasset *Taq* polymerase

Termineringsløsningene til *Taq* polymerase er hentet fra EMBO Practical course; DNA sequencing: Advanced approaches, automated methods and analysis, Ansorge *et al.*, 1992

- A-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 20 μ M av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 350 μ M ddATP
- C-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 20 μ M av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 200 μ M ddCTP
- G-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 20 μ M av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 30 μ M ddGTP
- T-term:** 10 mM Tris-HCl pH 9.5, 20 μ M av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 600 μ M ddTTP

5.3.5 Termineringsløsninger tilpasset *Tma* polymerase

Det ble her tatt utgangspunkt i termineringsløsningene til *Taq* polymerase beskrevet i fra EMBO Practical course; DNA sequencing: Advanced approaches, automated methods and analysis, Ansorge *et al.*, 1992

A-term:	10 mM Tris-HCl pH 9.5, 20 μ M av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 350 μ M ddATP
C-term:	10 mM Tris-HCl pH 9.5, 20 μ M av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 600 μ M ddCTP
G-term:	10 mM Tris-HCl pH 9.5, 20 μ M av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 30 μ M ddGTP
T-term:	10 mM Tris-HCl pH 9.5, 20 μ M av dATP, dCTP, dGTP og dTTP, og 1.8mM ddTTP

5.4 Ekspresjon av rekombinante proteiner

IPTG: Isopropyl- β -D-tiogalaktopyranosid. Levert fra Fermentas, produkt nr. #R0392. Løses i MQ-vann til ønsket konsentrasjon.

Løsninger for produksjon av grovlysat:

Buffer A (resuspensjonsbuffer):	50mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM D-Glukose, 1mM EDTA. Autoklaveres.
Buffer B (pre-lysisbuffer):	Buffer A tilsatt lysozym til 4 mg/ml
Buffer C (lysisbuffer):	10 mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl, 1mM EDTA, 0.5mM PMSF, 0.5% Tween-20, 0.5% Nonidet P-40. Løsningen autoklaveres før tilsetning av PMSF, Tween-20 og Nonidet P-40
Buffer D (lagringsbuffer):	50mM Tris-HCl pH 8.0, 50mM KCl, 0.1mM DTT, 0.5mM PMSF, 50 % Glyserol. Løsningen autoklaveres før tilsetning av DTT og PMSF.

5.5 Rensing og oppkonsentrering av proteiner

5.5.1 Fjerning av DNA

5 % streptomycinsulfat: Løs 5 g streptomycinsulfat i 100 ml MQ-vann.
Oppbevares ved 4°C i lysbeskyttet flaske.

5.5.2 Kromatografi av proteiner

Kolonner og kolonnematerialer er beskrevet i punkt 5.11

5.5.2.1. Hydrofob interaksjonskromatografi, HiPrep®16/10 Phenyl (low sub)

Startbuffer: 0.05 M Natriumfosfatbuffer, pH 7 med 1 M $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$

Elueringsbuffer: 0.05 M Natriumfosfatbuffer, pH 7

5.5.2.2 Ionebytterkromatografi, HiPrep® 16/10 Q XL

Startbuffer: 0.05 M Tris-HCl, pH 8

Elueringsbuffer: 0.05 M Tris-HCl pH 8 med 1 M NaCl

5.5.2.3 Gelfiltrering, Sephacryl™ S-200 High Resolution

Kalibreringsløsning: Blue Dextran og K_2CrO_4

Elueringsbuffer: 0.05 M Tris-HCl pH 8 med 0.1 M NaCl

5.6 Lowry-metoden

0.8 M NaOH: 32 g NaOH løses i MQ-vann til 1 liter

1 % DOC: 0.1 g DOC løses i 0.1 M NaOH til 10 ml

50 % TCA: 50 g TCA løses i MQ-vann til 100 ml

Lowry A: 0.1% $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 0.2% Natrium-tartat, 10% $\text{Na}_2\text{CO}_3 \times \text{H}_2\text{O}$

Lowry B: 1 volum Lowry A, 2 volumer 5% SDS, 1 volum 0.8 M NaOH. Løsningen er holdbar i 2-3 uker.

Lowry C: 1 volum Folin-Ciocalteu reagens, 5 volumer MQ-vann

BSA-standard: Bovint serum albumin løses til ønsket konsentrasjon i sterilt MQ-vann

5.7 SDS-PAGE

5.7.1 tillaging av geler til SDS-PAGE

**40 % akryl/bisakrylamid
gelløsning(19:1):**

Ferdig blanding fra Quantum

5 % separerende gel:

3.125ml 40 % akry/bisakrylamidblanding, 15.12ml MilliQ-vann, 6.25ml Tris-HCl pH 8.8, 0.25ml 10 % SDS, 0.25ml 10% ammonium persulfat (APS) og 20µl TEMED. Løsningen filtreres før tilsetning av SDS, APS og TEMED.

10 % separerende gel:

6.2ml 40 % akry/bisakrylamidblanding, 12ml MilliQ-vann, 6.3ml Tris-HCl pH 8.8, 0.25ml 10 % SDS, 0.25ml 10 % ammonium persulfat (APS) og 10µl TEMED. Løsningen filtreres før tilsetning av SDS, APS og TEMED.

5 % stacking-gel:

1.14ml 40 % akryl/bisakrylamidblanding, 5.36ml MilliQ-vann, 0.95ml Tris-HCl pH 6.8, 0.75ml 10% SDS, 0.75ml 10% ammonium persulfat (APS) og 7.5µl TEMED. Løsningen filtreres før tilsetning av SDS, APS og TEMED.

Ferdiglagede geler:

4-20% gradientgel i Tris-HCl fra BioRad. Art.nr. 161-1123EDU

5.6.2 Tillaging av prøver til SDS-PAGE

3 x SDS prøvebuffer:

Ferdig blandet fra New England Biolabs, #7703S

Proteinmarkør:

Protein Marker Broad Range, 6-175 kDa, fra New England Biolabs, #P7702S

SDS-PAGE runningbuffer: 15g Tris-base, 72g Glysin, 50ml 10 % SDS tilsettes MilliQ-vann til en liter.

5.7.3 Comassie-farging av geler etter SDS-PAGE:

Comassie fargeløsning:	0.625g Comassie Brilliant Blue R-250 tilsettes 25ml konsentrert eddiksyre og metanol:MilliQ-vann (1:1) til 250 ml.
Avfargingsløsning:	30 % metanol og 10 % eddiksyre i MilliQ-vann

5.7.4 sølvfarging av geler etter SDS-PAGE:

Fikseringsløsning:	50 % metanol og 10 % eddiksyre
8.3 % Glutardialdehyd:	25 % glutardialdehyd fortynnes med 2/3 vann
Sølvløsning:	Tilsett 1.5 ml 25 % NH_3 og 4.0 ml 20 % AgNO_3 til 21 ml nylaget 1N NaOH (1g til 250 ml vann). Juster volumet til 100 ml med MilliQ-vann.
Fremkaller:	Tilsett 150 μl formaldehyd til 1.5 ml 1 % sitronsyre og juster volumet til 300 ml med MilliQ-vann.
Stoppløsning:	Tilsett 150 μl etanolamin til 15 ml 1 % sitronsyre og Juster volumet til 300 ml med MilliQ-vann.

5.7.5 Tørrking av proteingeler:

Geltørkerløsning:	Tilsett 25 ml glyserol til 500 ml metanol og 475 ml MilliQ-vann.
--------------------------	--

5.8 Polymerase-aktivitetsassay

10 x polA buffer:	500 μl Tris-HCl pH 8.5, 50 μl MgCl_2 og 450 μl MQ-vann
TE-buffer, pH 8:	10 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA. Autoklaveres

5.9 Generelle løsninger og buffere

MilliQ-vann:	Ultrarent destillert vann som er rensset på Millipore MQ-systemet. Vannet blir autoklavert før bruk.
---------------------	--

1 M Tris-HCl, pH 8:	121.1 g Tris base løses i MQ-vann til 800 ml. PH justeres med konsentrert HCl til 8 (ca.42 ml). Tilsett MQ-vann til 1 l. Autoklaveres før bruk.
TE-buffer, pH 8:	10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA. Autoklaveres før bruk.
1 M MgCl₂:	20.33 g MgCl ₂ x 6 H ₂ O løses i MQ-vann til 100 ml. Autoklaveres før bruk.
1M KCl:	7.45 g KCl løses i MQ-vann til 100 ml. Autoklaveres før bruk.
1 M NaCl:	5.8 g NaCl løses i MQ-vann til 100 ml. Autoklaveres før bruk.
10 % SDS:	10 g SDS løses i MQ-vann til 100 ml.
10 mM PMSF:	17.4 mg PMSF løses i isopropanol til 10 ml.
1 M DTT:	3.09 g DTT løses i 0.01 M natrium-acetat med pH 5.2 til 20 ml.
Fenol:klorform (1:1):	bland like mengder fenol og kloroform. Ekvilibrer blandingen ved å ekstrahere flere ganger med 0.1 M Tris-HCl pH 7.6. Oppbevares mørkt.
10 % APS:	1 g APS løses i MQ-vann til 10 ml. Lagres ved -20°C.

5.10 Formel benyttet under usikkerhetsregning

Formel benyttet under beregning av standardavvik (std) til flere paralleller:

$$\text{Std} = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^{i=n} (X_i - \bar{X})^2}}{n-1}$$

n = antall målinger
X = måleverdi
 \bar{X} = gjennomsnittsverdien til målingene

Formel benyttet for å beregne midlet standardavvik(mstd):

$$\text{Mstd} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{i=n} (Y_i^2)}{n}}$$

Y = standardavviket til en måling
n = antall målinger i en målserie

5.11 Kjemikalier og reagenser

Agarose.....	Duchefa,	Prod. nr. DU0463
Ammoniumpersulfat (APS).....	Sigma,	Prod. nr. A-3678
Ammoniumsulfat ((NH ₄) ₂ SO ₄)	Merck,	Prod. nr. 1.01217
Ampicillin (Doktacillin®).....	Astra,	Prod. nr. 187591
Baktoagar.....	Difco,	Prod. nr. 0140-01
Bind-Silane.....	Pharmacia,	Prod. nr. 17-1330
Blue Dextran 2000.....	Pharmacia,	Prod. nr. 17-0360
Bovint serum albumin (BSA)	Sigma,	Prod. nr. A-4503
Bromfenolblått.....	Sigma,	Prod. nr. B7021
2-Butanol.....	Merck,	Prod. nr. 1.09630
Coomassie Brilliant Blue G 250.....	Bio-Rad,	Prod. nr. 161-0406
Deoksyholat (DOC)	Sigma,	Prod. nr. D-4297
Dimetylsulfoksid (DMSO)	Fluka,	Prod. nr. 41641
Dinatriumetylendiamintetraacetat (EDTA-Na ₂)...	Sigma,	Prod. nr. E-5134
Dithiotreitol (DTT)	Saveen,	Prod. nr. S2150
Eddiksyre (iseddik) (AcOH).....	Merck,	Prod. nr. 1.00063
Etanol (Rektifisert- og Absolutt-alkohol).....	Arcus,	
Etidiumbromid (EtBr)	QBIOgene,	Prod. nr. EtBC1001
Fenol.....	QBIOgene,	Prod. nr. 130181
Fenylmetylsulfonylfluorid (PMSF).....	Sigma,	Prod. nr. P-7626
Folin-Ciocalteureagenset	Sigma,	Prod. nr. F-9252
Formaldehyd (HCOH).....	Merck,	Prod. nr. 1.04003
Formamid (deionisert).....	Merck,	Prod. nr. 1.09684
Gjærekstrakt	Difco,	Prod. nr. 0127-179
D-Glukose (Druesukker).....	Norsk	
	Med.dep.,	Prod. nr. 309252
Glutaraldehyd.....	J.T Baker	Prod. nr. 7415
Glyserol	Norsk	
	Med.dep.,	Prod. nr. 210500
Glysin (Gly)	Sigma,	Prod. nr. G-7126
Isopropanol (2-propanol).....	PROLABO,	Prod. nr. 20842.298
Isopropylthiogalactosid (IPTG)	Saveen,	Prod. nr. S2140
Kaliumacetat (KAc).....	Sigma,	Prod. nr. P-5708
Kaliumkarbonat (K ₂ CO ₃)	Merck,	Prod. nr. 1.04928
Kaliumklorid (KCl).....	Merck,	Prod. nr. 1.4936
Kaliumhydroksid (KOH).....	Merck,	Prod. nr. 1.05033
Kalsiumklorid (CaCl ₂).....	Merck,	Prod. nr. 1.2382
Kloroform	Merck,	Prod. nr. 1.2445
Kobbersulfat (CuSO ₄ x5H ₂ O).....	Merck,	Prod. nr. 1.02790
Magnesiumklorid (MgCl ₂).....	Merck	Prod. nr. 1.5927
Metanol (MeOH)	PROLABO,	Prod. nr. 20847.295
Natriumacetat (NaOAc)	Merck,	Prod. nr. 1.6268
Natriumdodesylsulfat (SDS).....	Saveen,	Prod. nr. S198223
Natriumhydroksid (NaOH).....	Merck,	Prod. nr. 1.3301
Natriumkarbonat (Na ₂ CO ₃ xH ₂ O).....	Merck,	Prod. nr. 1.6392
Natriumklorid (NaCl)	PROLABO,	Prod. nr. 27810.295
Natriumtartat (C ₄ H ₄ O ₆ Na ₂).....	Sigma,	Prod. nr. S-8640

Natriumthiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$)	Sigma,	Prod. nr. P-1648
Nonidet P-40.....	Sigma,	Prod. nr. N-6507
1,4-Piperazindietansulfonsyre (PIPES).....	Merck,	Prod. nr. 1.2030
Polyetylenglykol (PEG-8000).....	Sigma,	Prod. nr. P-5413
Saltsyre (HCl)	PROLABO,	Prod. nr. 20252.29
Streptomycinsulfate.....	Sigma,	Prod. nr. S-6501
Sølvnitrat (AgNO_3)	KEBOLab,	Prod. nr. 5.2384.25
Tetrametyletylendiamin (TEMED).....	Bio-Rad,	Prod. nr. 161-0800
Tris-base (TRIZMA [®] -base).....	Sigma,	Prod. nr. T-1503.
Trypton	Difco,	Prod. nr. 0123-173
Tween-20.....	Saveen,	Prod. nr. S1362001
Urea.....	GIBCOBRL,	Prod. nr. 15505027

5.12 Apparater og utstyr benyttet i oppgaven

Apparater og utstyr benyttet i oppgaven er ført opp i listen nedenfor. Type og produsent er ført opp.

Agarosegel-elektroforese.....	Biomax QS 710/MP1015, Kodak.
Dialysepose.....	Pierce SnakeSkin TM
DNA-sekvensering	ALFexpress TM DNA sequencer, Amersham Biosciences MegaBace DNA Analysis Systems, Amersham Biosciences
Dyrkningsinkubatorer.....	Model T-51, New Brunswick TM Scientific Co. Inc. Model G-25, New Brunswick TM Scientific Co. Inc. Avanti TM J-25, Beckman,
Fotoutstyr.....	Polaroid MP-4, svart/hvitt.
Gelfiltrering.....	Kolonnemateriale, Sephacryl TM S-200 High Resolution, Amersham Biosciences Kolonne, XK 26/100, Amersham Biosciences Pakke Reservoir, RK 16/26, Amersham Biosciences Flanging Start up kit, Amersham Biosciences
Gel-tørker.....	Savant med Edwards nr. 5
vakumpumpe.	
Hydrofob interaksjonskromatografi.....	HiPrep 16/10 Phenyl (low sub), Amersham Biosciences
Ionebytterkromatografi.....	HiPrep TM 16/10 Q XL, Amersham Biosciences
Kuvetter.....	1938 PS Mikrokuvetter, dispolab Kartell. Kvartskuvetter, Starna Ltd. Plastkuvetter, Saastedt

Luminescens spektrometer.....	Model LS50B, Perkin Elmer.
Magnetrører.....	Combimag RCO, IKA.
PCR-blokk.....	PTC-100, MJ Research Inc. PTC-200, MJ Research Inc.
pH-meter.....	pH meter 28, Radiometer Copenhagen.
Pipetter.....	Jencons, Sealpette
Pipettespisser.....	Saarstedt.
Plast-rør.....	15 og 50 ml rør, Saarstedt. 1,5 ml eppendorf-rør, Saarstedt. 0,5 ml PCR- og sekvenserings-rør, Saarstedt.
SDS-PAGE.....	Vertikal Mini-Slab Gel-system, Hoefer. BioRad Criterion™Cell
Sentrifuger.....	Microfuge, Qualitron Inc. Biofuge pico, Heraeus instruments.
Spektrofotometer.....	UV-1601, Shimadzu.
UV-illuminator.....	Ultraviolet Products Inc. U.S.A.
Vakuumfilter.....	0,45 µm, Saarstedt.
Vannbad.....	Tempette junior TE-8J, Techne.
Varmeblokk.....	DB-2D, Techne.
Vippebord.....	Duomax 1030, Heidolph
Vortexer.....	MS1 Minishaker, IKA

Referanser

Amblar, M., de Lacoba, M.G., Corrales, M.A. & Lopez, P. Biochemical Analysis of Point Mutations in the 5'-3' Exonuclease of DNA Polymerase I of *Streptococcus pneumoniae*. *J. Biol. Chem.* **276**: 19172-19181 (2001)

Ansorge, W., Kristensen, T., Sproat, B. & Voss, H. DNA Sequencing: advanced approaches, automated methods and analysis. *EMBO practical course*: 53-54 (1992)

Astatke, M., Grindley, N.D.F. & Joyce, C.M. How *E.coli* DNA Polymerase I (Klenow fragment) Distinguishes between Deoksy- and Dideoksynucleotides. *J. Mol. Biol.* **203**: 147-165 (1998)

Beese, L.S., Derbyshire, V. & Steitz, T.A. Structure of DNA Polymerase I Klenow Fragment Bound to Duplex DNA. *Science* **260**: 352-355 (1993)

Beese, L.S., & Steitz, T.A. Structural basis for the 3'-5' exonuclease activity of *Escherichia coli* DNA polymerase I: a two metal ion mechanism. *EMBO J* **10**: 25-33 (1991)

Bocchetta, M., Gribaldo, S., Sanangelantoni, A. & Cammarano, P. Phylogenetic Depth of the Bacterial Genera *Aquifex* and *Thermotoga* Inferred from Analysis of Ribosomal Protein, Elongation factor, and RNA Polymerase Subunit Sequences *J. Mol. Evol.* **50**: 366-380 (2000)

Braithwaite, D.K. & Ito, J. Compilation, alignment and phylogenetic relationships of DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **21**: 787-802 (1993)

Carrol, S.S., Cowart, M. & Benkovic, S.J. A mutant polymerase I (Klenow fragment) with reduced fidelity. *Biochemistry* **30**: 804-813 (1991)

Carver, T.E., Hochstrasser, R.A. & Millar, D.P. Proofreading DNA: Recognition of aberrant DNA termini by the Klenow fragment of DNA polymerase I. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 10670-10674 (1994)

Cline, J., Braman, J.C. & Hogrefe, H.H. PCR fidelity of *Pfu* DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acid Res.* **24**: 3546-3551 (1996)

Delarue, M., Poch, O., Tordo, N., Moras, D. & Argos, P. An attempt to unify the structure of polymerases *Prot. Eng.* **3**: 461-467 (1990)

Derbyshire, V., Grindley, N.G.F. & Joyce, C.M. The 3'-5' exonuclease of DNA polymerase I of *Escherichia coli*: contribution of each amino acid at the active site to the reaction. *EMBO J* **10**: 17-24 (1991)

Diaz, R.S. & Sabino E.C. Accuracy of replication in polymerase chain reaction. Comparison between *Thermotoga maritima* DNA polymerase and *Thermus aquaticus* DNA polymerase (abstract). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **10**: 1239-1242 (1998)

- Duss, S. Cloning and Expression of DNA polymerase I from *Thermotoga maritima*. *Oppgave ved biokjemisk institutt, UiO* (2000)
- Eom, S.H., Wang, J. & Steitz, T.A. Structure of *Taq* polymerase with DNA at the polymerase active site. *Nature* **382**:278-281 (1996)
- Freemont, P.S., Friedman, J.M., Beese, L.S., Sanderson, M.R. & Steitz, T.A. Cocystal structure of an editing complex of Klenow fragment with DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**: 8924-8928 (1988)
- Friedberg, E.C. Why do cells have Multiple Error-Prone DNA Polymerases? *Environmental and Molecular mutagenesis* **38**: 105-110 (2001)
- Gaberc-Porekar, V. & Menart V. Perspectives of immobilized-metal affinity chromatography. *J. Biochem. Biophys. Methods* **49**: 335-360 (2001)
- Gelfand, D.H., Lawyer, F.C. & Stoffel, S. Mutated thermostable nucleic acid polymerase enzyme from *Thermotoga maritima* *United States Patent* **5,420,029** (1995)
- Gerlach, V.L., Aravin, L., Gotway, G., Schultz, R.A., Koonin, E.V. & Friedberg, E.C. Human and mouse homologs of *Escherichia coli* DinB (DNA polymerase IV), members of the UmuC/DinB superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 11922-11927 (1999)
- Hamilton, S.C., Farchaus, J.W. & Davis, M.C. DNA polymerases as engines for biotechnology. *Biotechniques* **31**: 370-383 (2001)
- Huang, Y-P. & Ito, J. The hyperthermophilic bacterium *Thermotoga maritima* has two different classes of family C DNA polymerases: evolutionary implications *Nucleic Acids Res.* **26**: 5300-5309 (1998)
- Johnson, R.E., Washington, M.T., Prakash, S. & Prakash, L. Bridging the gap: A family of novel DNA polymerases that replicate faulty DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 12224-12226 (1999)
- Karshikoff, A. & Ladenstein, R. Ion pairs and the thermotolerance of proteins from hyperthermophiles: a "traffic rule" for hot roads. *TRENDS in Biochemical Sciences* **26**: 550-556 (2001)
- Kelmn, Z., Hurwitz, J. & O'Donnell, M. Processivity of DNA polymerases: two mechanisms, one goal. *Structure* **6**: 121-125 (1998)
- Kiefer, J.R., Mao, C., Braman, J.C. & Beese, L.S Visualizing DNA replication in a catalytically active *Bacillus* DNA polymerase crystal. *Nature* **391**: 304-307 (1998)
- Klenow, H. & Henningsen, I. Selective elimination of the exonuclease activity of the deoksyribonucleic acid polymerase from *Escherichia coli* B by limited proteolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* **65**: 168-175 (1970)

- Kornberg, A. & Baker, T. DNA replication, 2nd edition. W. H. Freeman & Company, New York, USA. (1992)
- Kornberg, A., Lehmann, I.R., Bessman, M.J. & Simms, E.S. The early history of DNA polymerase: a commentary by Arthur Kornberg. *Biochim.Biophys. Acta* **1000**: 53-56 (1989)
- Kornberg, T. & Gefter, M.L. Purification and DNA Synthesis in Cell-Free Extracts: Properties of DNA Polymerase II. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**: 761-764 (1971)
- Kornberg, T. & Gefter, M.L. DNA synthesis in cell-free extracts of a DNA polymerase-defective mutant. *Biochem.Biophys. Res. Commun.* **6**: 1348-1355 (1970)
- Kristiansen, B.E. Kloning, ekspresjon og karakterisering av DNA polymerase I fra eubakterien *Chloroflexus auranticus*. *Hovedfagsoppgave ved Biokjemisk institutt UiO*, (2000)
- Kumar, S. & Nussinov, R. How do thermophilic proteins deal with heat? *CMLS* **58**: 1216-1233 (2001)
- Kunkel, T.A & Bebenk, K. DNA replication fidelity. *Annu. Rev. Biochem.* **69**: 497-529 (2000)
- Li, Y., Korolev, S. & Waksman, G. Crystal structures of open and closed forms of binary and ternary complexes of the large fragment of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: structural basis for nucleotide incorporation. *EMBO J* **17**: 7514-7525 (1998)
- Nelson, K.E., Clayton, R.A., Gill, R.S. & Gwinn, M.L. Evidence for lateral gene transfer between Archea and Bacteria from genome sequence of *Thermotoga maritima*. *Nature* **399**: 323-329 (1999)
- Nesbø, C.L., L'Haridon, S., Stetter, K.O & Doolittle, W.F. Phylogenetic Analyses of Two "Arcael" Genes in *Thermotoga maritima* Reveal Multiple Transfers Between Archaea and Bacteria. *Mol. Biol. Evol.* **18**: 362-375 (2001)
- Patel, P. H., Suzuki, M., Adman, E., Shinkai, A. & Loeb, L. A. Prokaryotic DNA Polymerase I: Evolution, Structure and "Base Flipping" Mechanism for nucleotide Selection. *J. Mol. Biol.* **308**: 823-837 (2001)
- Pelletier, H., Sawaya, M.R., Kumar, A., Wilson, S.H. & Kraut, J. Structures of Ternary Complexes of rat DNA Polymerases β , a DNA Template-Primer and ddGTP. *Science* **264**: 1891-1902 (1994)
- Polesky, A.H., Steitz, T.A., Grindley, N.D.F. & Joyce, C.M. Identification of residues critical for the polymerase activity of DNA polymerase I of *Escherichia coli*. *J.Biol. Chem.* **265**: 14579-14591 (1990)
- Prober, J.M. A system for rapid DNA sequencing with fluorescent chain-terminating dideoxynucleotides. *Science* **238**: 336-341 (1987)

- Richards, J., Bloom, C. & Brandis, J. DNA polymerases having improved labelled nucleotide incorporation properties. Pat.nr. **WO 9840496** (1998)
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* **239**: 487-491 (1988)
- Saiki, R.K., Scharf, S., Falloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. & Arnheim, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354 (1985)
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5436-5467 (1977)
- Shinkai, A., Patel, P.H. & Loeb, L.A. The Conserved Active site motif A of *Escherichia coli* DNA Polymerase I is Highly Mutable. *J. Biol. Chem.* **276**: 18836-18842 (2001)
- Siefert, J.L. & Fox, G.E. Phylogenetic mapping of bacterial morphology. *Microbiology* **144**: 2803-2008 (1998)
- Sloane, D.L., Goodman, M.F. & Echols, H. The fidelity of base selection by the polymerase subunit of DNA polymerase III holoenzyme. *Nucleic Acids Res.* **16**: 6465-6475 (1988)
- Smith, L.M. Fluorescence detection in automated DNA sequence analysis. *Nature* **321**: 674-678 (1986)
- Sousa, R. Structural and mechanistic relationships between nucleic acid polymerases. *TIBS*: 186-190 **May-1996**
- Steitz, T.A. A mechanism for all polymerases *Nature* **391**: 231-232 (1998)
- Sutton, M.D. & Walker, G.C. Managing DNA polymerases: Coordinating DNA replication, DNA repair and DNA recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 8342-8349 (2001)
- Suzuki, M., Baskin, D., Hood, L. & Loeb, L. A. Random mutagenesis of *Thermus aquaticus* DNA polymerase I: Concordance of immutable sites *in vivo* with the crystal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**: 9670-9675 (1996)
- Tabor, S. & Richardson, C.C. A single residue in DNA polymerases of the *Escherichia coli* DNA polymerase I family is critical for distinguishing between deoxy- and dideoxynucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **92**: 6339-6343 (1995)
- Tabor, S. & Richardson, C.C. Selective inactivation of the exonuclease activity of bacteriophage T7 DNA polymerase by *in vitro* mutagenesis. *J. Biol. Chem.* **264**: 6447-6458 (1989)

- Thompson, E.H.Z., Bailey, M.F., van der Schans, E.J.C., Joyce, C.M. & Millar, D.P. Determinants of DNA Mismatch Recognition within the Polymerase Domain of the Klenow Fragment. *Biochemistry* **41**: 713-722 (2002)
- Tveit, H. & Kristensen, T. Fluorescence-based DNA Polymerase Assay. *Anal. Biochem.* **289**: 96-98 (2001)
- Tveit, H. Kloning, ekspresjon og rensing av DNA polymerase I fra *Bacillus cereus*, og utvikling av en fluorescensbasert polymeraseaktivitetsanalyse. *Hovedfagsoppgave ved Biokjemisk institutt UiO*, (2000)
- Vander Horn, P.B., Davis, M.C., Cunniff, J.J., Ruan, C., McArdle B.F., Samols, S.B., Szasz, J., Hu, G., Hujer, K.M., Domke, S.T., Brummet, S.R., Moffett, R.B. & Fuller, C.W. *ThermoSequenase*TM DNA polymerase and *T. Acidophilum* pyrophosphatase: New thermostable enzymes for DNA sequencing. *Biotechniques* **22**: 758-762 (1997)
- Watson, J.D. & Crick, F.H.C. Genetical implications of the structure of deoksyrribonucleic acid. *Nature* **30**: 964-967 (1953)
- Xu, Y., Derbyshire, V., Ng, K., Sun, X.C., Grindley, N.D.F & Joyce, C.M. Biochemical and Mutational Studies of the 5'-3' Exonuclease of the DNA Polymerase I of *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **268**: 284-302 (1997)
- Xu, Y., Potapova, O., Leschziner, A.E., Grindley, N.D.F. & Joyce, C.M. Contacts between the 5' Nuclease of DNA Polymerase I and its DNA Substrate *J. Biol. Chem.* **276**: 30167-30177 (2001)